



COMUNICADO  
TÉCNICO

257

Teresina, PI  
Fevereiro, 2021

**Embrapa**

# Metodologia científica: Isolamento rápido de *Pseudocercospora cruenta* (Sacc.) Deighton em folhas de feijão-caupi

Candido Athayde Sobrinho  
Ananda Rosa Beserra Santos

# Metodologia científica: Isolamento rápido de *Pseudocercospora cruenta* (Sacc.) Deighton em folhas de feijão-caupi<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> *Candido Athayde Sobrinho*, engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI. *Ananda Rosa Beserra Santos*, engenheira-agrônoma, doutora em Fitopatologia, professora da Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI.

## Introdução

As doenças de plantas causadas por fungos são diagnosticadas inicialmente pelos sintomas que provocam e, sobretudo, pelos sinais dos patógenos presentes no hospedeiro doente (Carollo; Santos Filho, 2016). Os sinais correspondem às estruturas vegetativas e reprodutivas do agente causal da doença que crescem à superfície das lesões. Todavia, para fechar o diagnóstico, torna-se imprescindível proceder ao isolamento do agente causal em meios artificiais, visando cumprir a primeira etapa dos Postulados de Koch (Amorim; Salgado, 1995; Agrios, 2005).

Ocorre que alguns patógenos são de difícil crescimento em meio artificial, tornando essa etapa muito trabalhosa e, às vezes, inviável. É

o caso do fungo *Pseudocercospora cruenta* (Sacc.) Deighton, agente causal da cercosporiose do feijão-caupi, que tem crescimento muito lento em meios artificiais de cultivo, por apresentar desvantagem competitiva em relação ao crescimento de outros microrganismos contaminantes e/ou endofíticos presentes nas lesões, quando se busca isolamento, empregando-se os métodos convencionais (Santos; Athayde Sobrinho, 2018). Nesse caso, os oportunistas rapidamente colonizam o meio de cultura em detrimento do patógeno alvo. Assim, diante dessa dificuldade, objetivou-se com este trabalho desenvolver uma metodologia alternativa, visando tornar o processo de isolamento de *P. cruenta* mais simples, rápido e eficiente.

# Materiais/Meio de cultura/ Equipamentos

## Materiais

- Balão volumétrico (1000 mL)
- Placas de Petri (10 cm de diâmetro)
- Pipeta graduada
- Luvas de procedimento
- Lamparina de álcool
- Máscara cirúrgica descartável
- Álcool 70° INPM
- Ágar microbiológico
- Filme plástico
- Suco de tomate industrializado

## Meio de cultura

- Suco de tomate Ágar (STA)

## Equipamentos

- Balança de precisão
- Microscópio estereoscópico
- Autoclave
- Capela de fluxo laminar com lâmpada germicida

# Preparação para o procedimento

Antes da realização do processo de isolamento propriamente dito, faz-se necessária a realização de algumas etapas básicas, de forma a garantir o sucesso da metodologia. Entre elas, destacam-se:

a) Preparação do meio de cultura - O meio de cultura usado para o fungo tem como ingredientes o suco de tomate industrial e ágar. Para 1.000 mL, são utilizados 200 mL do suco de tomate, aos quais são adicionados 20 g de ágar bacteriológico fundente e água destilada em quantidade suficiente para completar o volume final de 1.000 mL de um balão volumétrico de 2 L empregado na preparação do meio.

b) Esterilização do meio de cultura - O meio, depois de preparado, é esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 minutos. Para tanto, o volume de 1.000 mL é dividido em quatro erlenmeyers de 500 mL, e cada um deles recebe o volume de apenas 250 mL. Em seguida, eles são fechados com tampo de algodão estéril, imediatamente envolvidos com papel pardo e encaminhados ao autoclave.

c) Distribuição do meio nas placas de Petri - Após a esterilização, o meio é resfriado naturalmente em temperatura ambiente e, antes de solidificar, é cuidadosamente vertido em placas de Petri (aproximadamente 20 mL/placa), em ambiente estéril (capela de fluxo laminar) ou em bancada de laboratório, com auxílio de lamparina de álcool. Todavia, normalmente, opta-se pelo uso de uma capela de fluxo laminar, previamente esterilizada.

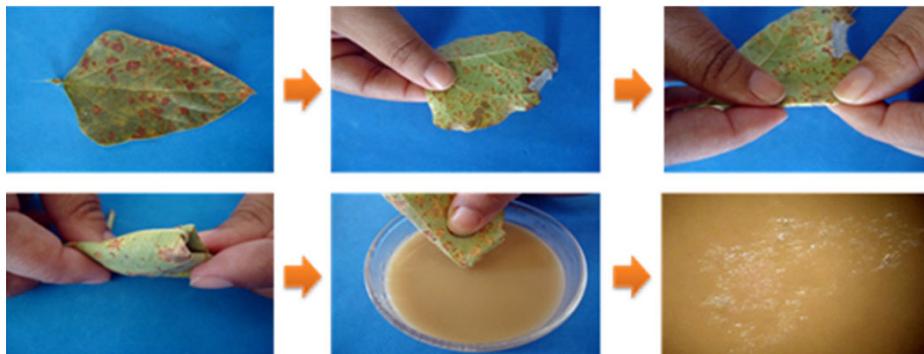
d) Vedação e estocagem das placas - Após o meio de cultura ser vertido nas placas de Petri, elas são vedadas com filme plástico, estando prontas para uso imediato ou para estocagem em geladeira para uso posterior.

## Descrição dos procedimentos

Depois de testadas várias metodologias (Cordeiro et al., 2011; Santos et al., 2014), chegou-se ao presente método que consiste em coletar uma folha de feijão-caupi com sintomas típicos

da doença e, sem nenhuma medida visando à desinfestação da parte atacada, fazer uma dobradura expondo a parte abaxial da folha, de modo que o vértice da dobradura corresponda ao centro da lesão para, assim, expor os conídios e conidióforos do fungo. Em uma bancada de laboratório, previamente desinfetada com álcool 70° INPM, abre-se cuidadosamente uma placa de Petri que contenha meio de cultura Suco-de-Tomate-Ágar (STA) e depositam-se delicadamente as referidas estruturas fúngicas na superfície do meio, tocando suavemente o vértice da dobradura da folha sobre o substrato (Figura 1).

Em seguida, fecha-se a placa de Petri com filme plástico, flambando previamente suas bordas. Após 15-20 horas, sob microscópio estereoscópico, efetua-se a transferência das estruturas em crescimento (conídios em germinação e micélio em crescimento) na superfície do meio para uma nova placa de Petri que contenha igual substrato. A metodologia foi validada com o auxílio de cinco colaboradores, que realizaram o processo por dez vezes.



Fotos: Candido Athayde Sobrinho

**Figura 1.** Passo a passo do isolamento de *Pseudocercospora cruenta* a partir de lesões esporulantes presentes em folhas de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.].

## Resultados

Após a realização dos procedimentos de validação da presente metodologia, ficou evidenciado que em 2 a 3 dias as colônias puras de *P. cruenta* estavam desenvolvidas e prontas para uso. Na Figura 2, pode-se observar o início do desenvolvimento fúngico, 15 horas depois de realizado o isolamento. Nas setas, estão destacadas minúsculas estruturas que correspondem aos conídios, com seus tubos germinativos, além do crescimento de fragmentos de algumas hifas já formando novo micélio. Neste momento, deve ser feita a repicagem para outras placas de Petri que contenham o mesmo meio de cultura.

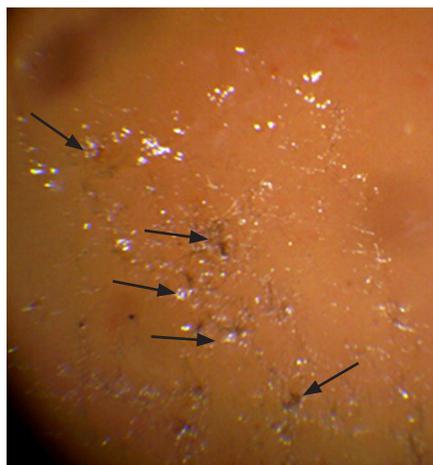


Foto: Candido Athayde Sobrinho

**Figura 2.** Início do desenvolvimento de *Pseudocercospora cruenta* em meio STA, 15 horas após o isolamento.

Nas Figuras 3 e 4, são mostradas a colônia pura do fungo, bem desenvolvida, e a fotomicrografia de hifas e conídio, respectivamente.

Foto: Candido Athayde Sobrinho



**Figura 3.** Colônia pura de *Pseudocercospora cruenta*, após três dias em franco desenvolvimento e prontas para o uso.

Foto: Candido Athayde Sobrinho



**Figura 4.** Fotomicrografia de fragmentos de hifa, demonstrando a presença de conídio do fungo, recuperados a partir da colônia pura de *Pseudocercospora cruenta*.

## Considerações

A metodologia aqui descrita é viável e apresenta resultados consistentes de recuperação do fungo *Pseudocercospora cruenta*, agente causal da cercosporiose, a partir de folhas de feijão-caupi com lesões esporulantes do fungo. Ela facilita sobremaneira a recuperação do patógeno detectado em campo de forma simples, rápida, com baixo custo e elevado índice de reprodutibilidade.

## Referências

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology** . 5th ed. New York: Academic, 2005. 922 p.
- AMORIM, L.; SALGADO, C. L. Diagnose. In: BERGAMIN FILHO, K. H.; AMORIM, L. (ed.). **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 224-232.
- CAROLLO, E. M.; SANTOS FILHO, H. P. **Manual básico de técnicas fitopatológicas**: laboratório de fitopatologia, Embrapa Mandioca e Fruticultura. Brasília, DF: Embrapa, 2016. 109 p.

CORDEIRO, Z. J. M.; ROCHA, H. S.; ARAÚJO, A. G. de. **Metodologia para manuseio de *Mycosphaerella musiocola* em laboratório**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011. 32 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Documentos, 198).

SANTOS, A. R. B.; ATHAYDE SOBRINHO, C. Método alternativo para isolamento direto de *Pseudocercospora cruenta* (Sacc.) Deighton em feijão-caupi. In: JORNADA

DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA MEIO-NORTE, 4., 2018, Teresina. **Resumos...** Brasília, DF: Embrapa, 2018. p. 45.

SANTOS, L. A.; SOUZA, P. E. de; POZZA, E. A.; CALDEIRA, D. M.; BOTELHO, D. M. dos S. Nova técnica para isolar *Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke, agente etiológico da cercosporiose do cafeeiro. **Coffee Science**, v. 9, n. 1, p. 142-144, 2014.

Exemplares desta edição  
podem ser adquiridos na:

**Embrapa Meio-Norte**

Av. Duque de Caxias, 5.650,  
Bairro Buenos Aires,  
Caixa Postal 01

CEP 64008-780, Teresina, PI

Fone: (86) 3198-0500

Fax: (86) 3198-0530

[www.embrapa.br/meio-norte](http://www.embrapa.br/meio-norte)

Sistema de atendimento ao Cliente(SAC)

[www.embrapa.br/fale-conosco/sac](http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac)

1ª edição (2021): formato digital

**Embrapa**



Comitê Local de Publicações  
da Unidade Responsável

Presidente

*Rosa Maria Cardoso Mota de Alcantara*

Secretário-Executivo

*Jeudys Araújo de Oliveira*

Membros

*Ligia Maria Rolim Bandeira, Edvaldo Sagrilo,  
Orlane da Silva Maia, Luciana Pereira dos  
Santos Fernandes, Francisco Jose de Seixas  
Santos, Paulo Henrique Soares da Silva, João  
Avelar Magalhães, Paulo Fernando de Melo  
Jorge Vieira, Alexandre Kemenes, Ueliton  
Messias, Marcos Emanuel da Costa Veloso,  
Jose Alves da Silva Câmara*

Supervisão editorial

*Ligia Maria Rolim Bandeira*

Revisão de texto

*Francisco de Assis David da Silva*

Normalização bibliográfica

*Orlane da Silva Maia (CRB-3/915)*

Diagramação

*Jorimá Marques Ferreira*

Fotos

*Candido Athayde Sobrinho*