

Foto: Bruno Schultz



## Uso do meio folha de eucalipto-ágar para esporulação de fungos isolados de *Eucalyptus benthamii*

Bruno Schultz<sup>1</sup>  
Celso Garcia Auer<sup>2</sup>  
Álvaro Figueredo dos Santos<sup>3</sup>

As doenças de plantas são diagnosticadas, principalmente, pelos sintomas que provocam e pelos sinais dos patógenos presentes no hospedeiro. Muitas vezes, o diagnóstico é realizado por meio da comparação dos sintomas apresentados em campo com chaves ou guias. Contudo, tornam-se necessárias técnicas adequadas de identificação do agente etiológico (SALGADO; AMORIM, 1995).

A identificação do agente causal se inicia com o isolamento a partir de tecidos da planta doente. O isolamento pode ser: (1) direto, onde a estrutura do patógeno é visualizada na planta hospedeira em lupa e transferida para meio de cultura; ou (2) indireto, que consiste no corte de partes lesionadas do hospedeiro, desinfestação superficial e transferência deste material ao meio de cultura (ALFENAS et al., 2007).

Os meios de cultura utilizados, que fornecem a base para nutrição, crescimento e esporulação do patógeno, em condições axênicas, são produzidos com soluções e substâncias nutritivas necessárias

ao seu crescimento e reprodução (ZAUZA et al., 2007), e podem conter partes da planta hospedeira que não sejam ricas em nutrientes, visando induzir somente a sua esporulação.

Rotineiramente, o meio batata-dextrose-ágar (BDA) é empregado para o isolamento indireto e purificação de colônias de fungos fitopatogênicos, independente do ponto de coleta na planta (FERREIRA, 1989). Porém, o meio BDA é muito rico em nutrientes, estimulando principalmente o crescimento vegetativo do fungo e, por vezes, não favorecendo a esporulação. No caso de patógenos foliares, Fisher et al. (1982) recomendaram o uso do meio carnation-leaf-ágar (CLA) preparado com folhas de cravo, para a esporulação de fungos, visando auxiliar a identificação taxonômica. Este meio tem sido muito utilizado, por ser um meio mais pobre e por estimular a esporulação. Porém, a dificuldade prática em se montar este meio é a necessidade de cultivo constante desta planta para se preparar este meio.

<sup>1</sup>Bruno Schultz, Engenheiro florestal, Mestre, schultzflorestal@gmail.com

<sup>2</sup>Engenheiro florestal, Doutor, Pesquisador da Embrapa Florestas, auer@cnpf.embrapa.br

<sup>3</sup>Engenheiro-agrônomo, Doutor, Pesquisador da Embrapa Florestas, alvaro@cnpf.embrapa.br

Desse modo, o objetivo deste trabalho foi, utilizando a disponibilidade de folhas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage, desenvolver um meio mais simples para o cultivo, que favoreça a esporulação de fungos patogênicos, visando tornar mais prática e rápida a identificação dos patógenos.

Os fungos empregados neste estudo foram *Cladosporium* sp., *Cylindrocladium candelabrum*, *Hainesia lythri* e *Pestalotiopsis* sp., obtidos a partir de material doente de eucalipto coletado de minicepas de *Eucalyptus benthamii* do viveiro do LAMEF/UFPR, Curitiba, PR. Esses isolados foram obtidos por isolamento direto, purificados e mantidos em placas com meio BDA (extrato comercial de batata, dextrose e ágar, 39 g; água destilada, 1.000 mL) no Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas.

Para induzir a produção de esporos, os isolados foram transferidos para placas de Petri contendo meio folha de eucalipto-ágar (FEA) e incubados a 25 °C, sob iluminação fluorescente constante. A partir do acompanhamento semanal, fez-se a avaliação do crescimento e tipo de esporulação dos fungos testados.

Para a elaboração do meio FEA, folhas saudáveis de *Eucalyptus benthamii* foram retiradas de árvores jovens (4 a 6 meses de idade) e colocadas inteiras ou em tiras em placas de Petri de vidro. As placas com folhas foram autoclavadas conforme recomendações de Dhingra e Sinclair (1995) por 15 minutos a 120 °C e posteriormente recobertas com meio ágar-água (ágar comercial, 20 g; água destilada 1.000 mL), antes da solidificação.

Discos de 5 mm de diâmetro contendo micélio-ágar dos isolados testados foram transferidos para as placas contendo meio FEA, sendo transferido um isolado por placa. Após o crescimento micelial e a formação de estruturas de reprodução, realizou-se o preparo de lâminas com fragmentos de meio FEA, observando-se as estruturas presentes sob microscópio óptico em aumentos de 100x e 400x.

A esporulação dos fungos testados ocorreu principalmente na superfície exposta da folha e muito pouco ou ausente no meio de cultura. Para os fungos *Hainesia lithri* e *Pestalotiopsis* sp., o micélio e os corpos de frutificação formados no meio FEA começaram a ser observados a partir do sétimo dia de incubação (Figuras 1 e 2).

Foto: Bruno Schultz



Foto: Bruno Schultz



Figura 1. Desenvolvimento de *Hainesia lythri* em meio FEA. A) formação de micélio; B) presença de estruturas reprodutivas sobre a folha.

Foto: Bruno Schultz



**Figura 2.** Desenvolvimento de micélio de *Pestalotiopsis* sp. em meio FEA.

No caso do fungo *Cylindrocladium candelabrum*, houve crescimento micelial ralo sobre a superfície do meio e da folha. Após sete dias de incubação, constatou-se a presença de conidióforos e conídios cilíndricos típicos do patógeno (Figura 3). Depois de dois meses de incubação, peritécios imaturos foram visualizados nas placas.

Foto: Bruno Schultz



**Figura 3.** Desenvolvimento de *Cylindrocladium candelabrum* em meio FEA.

Aparentemente, as folhas inteiras induziram uma maior produção de micélio e esporulação, provavelmente pela maior superfície para crescimento fúngico e por uma maior quantidade de nutrientes em relação às tiras de folhas de eucaliptos.

O fungo *Cladosporium* sp. não apresentou crescimento micelial significativo e não houve esporulação.

## Conclusões

O meio FEA foi considerado efetivo para o crescimento micelial de fungos isolados de eucalipto. Este meio induziu a formação de estruturas reprodutivas da maioria dos fungos testados, a exceção de *Cladosporium* sp. O meio FEA foi considerado viável e de rápido preparo, podendo ser utilizado em substituição do meio com folha de cravo.

## Referências

ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A.; MAFIA, R. G.; GONÇALVES, R. C. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; M (Ed.). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa, MG: UFV, 2007. p. 53-90.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434 p.

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa, MG: UFV, 1989. 570 p.

FISHER, N. L.; BURGESS, L. W.; TOUSSOUN, T. A.; NELSON, P. E. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, n. 1, p. 151-153, 1982.

SALGADO, C. L.; AMORIM, L. Sintomatologia. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1. p. 212-223.

ZAUZA, E. A. V.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; (Ed.). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa, MG: UFV, 2007. p. 23-50.

### Comunicado Técnico, 296

**Embrapa Florestas**  
**Endereço:** Estrada da Ribeira Km 111, CP 319 Colombo, PR, CEP 83411-000  
**Fone / Fax:** (0\*\*) 41 3675-5600  
**E-mail:** sac@cnpf.embrapa.br



Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento



1ª edição  
Versão eletrônica (2012)

### Comitê de Publicações

**Presidente:** *Patrícia Póvoa de Mattos*  
**Secretária-Executiva:** *Elisabete Marques Oaida*  
**Membros:** *Álvaro Figueredo dos Santos, Antonio Aparecido Carpanezi, Claudia Maria Branco de Freitas Maia, Dalva Luiz de Queiroz, Guilherme Schnell e Schuhli, Luís Cláudio Maranhão Froufe, Marilice Cordeiro Garrastazu, Sérgio Gaiad*

### Expediente

**Supervisão editorial:** *Patrícia Póvoa de Mattos*  
**Revisão de texto:** *Rafaele Crisóstomo Pereira*  
**Normalização bibliográfica:** *Francisca Rasche*  
**Editoração eletrônica:** *Rafaele Crisóstomo Pereira*