

## ARTIGOS

# VARIAÇÕES MORFOLÓGICAS E FISIOLÓGICAS EM ISOLAMENTOS DE *COLLETOTRICHUM GUARANICOLA*

MARIA DE LOURDES R. DUARTE<sup>1</sup>; FERNANDO C. DE ALBUQUERQUE<sup>1</sup> & MARIA P. F. CORRÊA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>EMBRAPA/CPATU, Caixa Postal 48, 66095-100 Belém, PA

<sup>2</sup>EMBRAPA/CNPCajú, R. Soares Bulcão, 1600, 60325 Fortaleza, CE

(Aceito para publicação em 09/09/94)

---

DUARTE, M.L.R.; ALBUQUERQUE, F.C. & CORRÊA, M.P.F. Variações morfológicas e fisiológicas em isolamentos de *Colletotrichum guaranicola*. Fitopatol. bras. 20: 141-144. 1995.

## RESUMO

A despeito da alta variabilidade genética, plantas de guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) são severamente afetadas pela antracnose causada por *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque em condições de campo. Devido à presença de diferentes tipos de lesão e à evolução da doença nos folíolos infectados, um estudo foi feito com o objetivo de verificar a existência ou não de diferentes patotipos na população do patógeno, em alguns locais do estado do Amazonas.

Oito patotipos foram obtidos a partir de isolamentos monospóricos oriundos de lesões individuais formadas em

folíolos jovens de diferentes plantas de guaranazeiro. Esses isolamentos apresentaram variações na velocidade de germinação, crescimento radial da colônia, tamanho dos esporos e patogenicidade em mudas sadias de guaranazeiro. As variações observadas não são suficientes para caracterizar esses isolamentos em raças fisiológicas do patógeno pela falta de plantas diferenciais.

Palavras chave: Fisiologia de fungos, guaraná, *Paullinia cupana* var. *sorbilis*, *Colletotrichum guaranicola*, patotipos.

## ABSTRACT

### Morphological and physiological variability among isolates of *Colletotrichum guaranicola* on guarana plants

In spite of high genetic variability, guarana plants (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) are severely affected by anthracnose caused by *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque in field conditions. Due to different appearance of lesions and evolution of the disease in infected leaflets, a study was made aiming to verify the presence or not of different pathotypes in the pathogen population in some localities of the State of Amazonas.

Eight single cell isolates of *C. guaranicola* exhibited a differential behaviour regarding speed of conidium germination, radial growth of the colonies, size of conidia and pathogenicity to guarana plants. However, the differences observed were not enough to assigned them as varieties or physiological races of the pathogen because of the lack of differential guarana plants.

## INTRODUÇÃO

A antracnose do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) causada por *Colletotrichum guarani-*

*cola* Albuquerque, é um dos fatores responsáveis pela baixa produtividade e decadência dos guaranazais nos municípios de Manaus, Maués, Parintins e Itocoatiara, no estado do Amazonas (Albuquerque, 1960; Corrêa, 1983).

Em levantamentos realizados em áreas experimentais da EMBRAPA em Manaus e em áreas localizadas ao longo da rodovia Manaus-Caracará e em Maués, observou-se que a maioria das plantas dessas áreas comportava-se como suscetível à antracnose em vários graus e, em cujos folíolos, as lesões evoluíam rapidamente levando até ao encarquilhamento e necrose total. Em outras plantas, as lesões nos folíolos eram localizadas e de evolução lenta. Essas diferenças na manifestação dos sintomas poderiam ser resultantes da maior ou menor suscetibilidade das plantas ou da presença de variantes fisiológicas do patógeno.

No presente trabalho são apresentadas e discutidas as características morfológicas de oito isolamentos de *C. guaranicola*, bem como os métodos de obtenção de culturas puras do patógeno e reprodução artificial dos sintomas da doença.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolamento do patógeno

Foram feitas coletas de folíolos jovens de guaranazeiro com sintomas iniciais de antracnose, em áreas experimentais da EMBRAPA em Manaus e Maués e, em áreas localizadas ao longo da rodovia Manaus-Caracará. A partir do material coletado procedeu-se ao isolamento do patógeno através das técnicas de transferência de porções de tecido retiradas da zona de transição entre o tecido sadio e o doente, desinfectadas previamente com solução de hipoclorito de cálcio a 0,59%; manutenção dos folíolos em câmara úmida por 48 h e posterior transferência dos esporos para tubos de ensaio contendo meio de batata-dextrose-ágar (BDA); preparo de suspensão a partir de esporos formados na superfície de uma única lesão, seguida da semeadura de 0,5 ml da suspensão em placas de ágar-água a 2% e transferência de um único esporo na fase inicial de germinação para tubos de ensaio contendo BDA ajustado para pH 4,5 (Duarte & Albuquerque, 1986). Após a repicagem os tubos foram incubados em câmara de crescimento à temperatura de  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , em regime alternado de 12 h luz/12 h escuro.

### Caracterização morfológica dos isolamentos

Discos de culturas puras do patógeno com 4 mm de diâmetro, retirados da zona de crescimento ativo das colônias foram transferidos para placas de Petri com BDA, a fim de se caracterizar os isolamentos quanto ao aspecto das colônias, dimensões dos esporos, tempo necessário para início da germinação e o crescimento radial. O crescimento radial foi registrado através da medição diária do diâmetro das colônias até que o diâmetro de uma delas atingisse 90 mm. Cada isolamento foi repetido cinco vezes. Para se determinar a velocidade de germinação cerca de 2 ml dos meios de cultura ágar-água e BDA foram vertidos sobre uma lâmina para microscopia. Após a solidificação dos meios de cultura foi atomizada uma suspensão de esporos dos diferentes isolamentos do patógeno. Essas lâminas ficaram incubadas em placas de Petri de 120 mm de diâmetro sobre dois círculos de papel de filtro umedecidos com água destilada, à temperatura

ambiente. O número de esporos germinados foi registrado em intervalos de 30 min a contar do início da germinação. Cada leitura representa o número médio de esporos germinados em 10 campos microscópicos no aumento de 400x. Os dados de comprimento e largura foram baseados em medições de 300 esporos.

### Preparo das mudas e inoculação

Mudas sadias de guaraná desenvolvidas por 12 meses em casa telada coberta com sombrite (40% de sombreamento) foram inoculadas, por atomização, com suspensão de esporos de *C. guaranicola* ( $10^4$  células  $\text{ml}^{-1}$ ) entre 8:00 e 10:00 h, 09:00 e 11:00 e 16:00 e 18:00 h. Após a inoculação, metade das mudas foi mantida em câmara úmida por 72 h enquanto que a outra metade permaneceu no ambiente da casa telada. As observações da manifestação dos sintomas foram feitas diariamente, durante 15 dias.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obtiveram-se oito isolamentos distintos de *C. guaranicola* nas áreas estudadas. As colônias formadas a partir de isolamentos monospóricos apresentaram coloração variando de amarelo claro a âmbar, sem desenho diferencial na face inferior. Algumas produziram esporos sobre um tecido estromático, outras originaram apenas massas de esporos. Em nenhuma colônia foi notada a formação de setas confirmando as observações de Albuquerque (1960). Os isolamentos 82-97-D e 84-Mau-4 mostraram-se mais estáveis quanto à aparência das colônias e capacidade de infectar os tecidos do hospedeiro. As demais apresentaram, freqüentemente, setores mutados da colônia. A colônia-tipo, descrita por Albuquerque (1960) e à qual pertence o isolamento 84-Mau-1, caracterizada por apresentar micélio compactado e por produzir esporos na superfície do micélio, só foi isolada de material oriundo de Maués, de onde o patógeno foi isolado pela primeira vez. De cada lesão foi obtido um tipo de colônia do fungo, parecendo indicar que ocorre uma mistura de tipos morfológicamente distintos nas áreas produtoras. Esse fato já foi observado em *Colletotrichum lindemuthianum* por Pio-Ribeiro & Chaves (1975) a partir de isolamentos oriundos de 25 campos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) da região Sudeste do Brasil.

Todos os isolamentos possuem esporos cilíndricos com uma das extremidades afilada, embora com dimensões diferentes. Os dados referentes à relação comprimento/largura (C/L) variou de 1,9 a 2,1. A maior relação C/L foi observada no isolamento 84-Tut-3, enquanto que a menor relação C/L foi notada no 82-97-D, entretanto essas diferenças parecem estar dentro do padrão para a espécie (Tabela 1).

A germinação dos conídios iniciou-se duas horas após a semeadura em ágar-água e BDA. Os isolamentos 84-Tut-1 e 84-Tut-3 atingiram o índice máximo de germinação (100%) seis horas após a semeadura, enquanto os demais atingiram índices semelhantes ou próximos entre sete e oito horas após a semeadura (Tabela 2). Não se observaram diferenças na velocidade de germinação quando os esporos

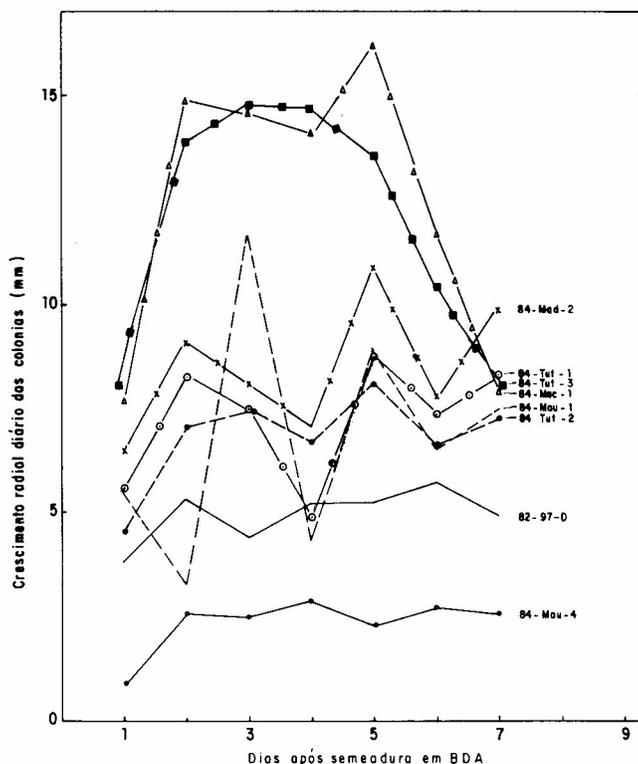
**TABELA 1 - Dimensões e relação comprimento/largura (C/L) dos esporos de isolamentos de *Colletotrichum guaranicola*.**

Isolamento	Comprimento* (µm)	Largura* (µm)	Relação C/L*
82-97-D	9,7 (6 - 16)	5,0 (4 - 10)	1,9 (1,5 - 1,6)
84-Mau-1	10,0 (8 - 14)	5,0 (4 - 10)	2,0 (2,0 - 1,4)
84-Mau-4	9,6 (8 - 16)	4,7 (4 - 8)	2,0 (2,0 - 2,0)
84-Mac-1	9,8 (8 - 14)	4,8 (4 - 10)	2,0 (2,0 - 1,4)
84-Mad-2	10,2 (6 - 16)	5,1 (4 - 10)	2,0 (1,5 - 1,6)
84-Tut-1	9,2 (6 - 16)	4,5 (4 - 8)	2,0 (1,5 - 2,0)
84-Tut-2	8,4 (6 - 14)	4,4 (4 - 8)	1,9 (1,5 - 1,8)
84-Tut-3	9,1 (6 - 14)	4,4 (4 - 8)	2,1 (1,5 - 1,8)

\* Média de 300 esporos com variações entre parênteses.

dos diferentes isolamentos foram semeados em ágar-água e BDA.

A medição diária do crescimento radial das colônias, expresso pela diferença entre o diâmetro do disco da colônia inicial e o diâmetro do crescimento diário, mostrou diferenças na taxa de crescimento. Os isolamentos 84-Mau-4 e 82-97-D apresentaram crescimento lento em relação aos demais, com acréscimos e decréscimos alternados de crescimento (Fig. 1). Os demais isolamentos apresentaram o mesmo padrão, isto é, acréscimos e decréscimos alternados de crescimento, porém com crescimento mais acelerado, exce-



**FIG. 1 - Fluxo diário do crescimento radial de oito isolamentos de *Colletotrichum guaranicola* em meio de cultura batata-dextrose-ágar (média de cinco repetições).**

**TABELA 2 - Velocidade de germinação de esporos de diferentes isolamentos de *Colletotrichum guaranicola* em ágar-água e batata-dextrose-ágar.**

Tempo após semeadura	Porcentagem de esporos germinados															
	82-97-D		84-Mac-1		84-Mad-2		84-Mau-1		84-Mau-4		84-Tut-1		84-Tut-2		84-Tut-3	
	BDA <sup>1*</sup>	Ágar <sup>2</sup>	BDA	Ágar												
120	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
150	0	10	1	11	0	0	0	1	4	4	5	5	9	2	4	8
180	1	19	10	18	1	2	3	8	15	13	29	26	19	13	15	15
210	8	25	23	29	8	12	15	16	23	21	49	43	29	23	28	28
240	28	55	35	39	17	21	29	24	33	26	63	53	38	33	45	49
270	38	58	49	52	28	33	33	33	41	34	80	73	47	43	61	61
300	51	67	63	64	37	41	45	43	49	41	88	82	58	52	73	74
330	61	74	77	73	47	48	56	51	58	47	93	87	66	59	91	88
360	72	83	89	81	59	59	69	61	63	53	100	96	74	69	100	97
390	79	89	96	88	69	67	80	72	71	61	-	-	83	79	-	-
420	85	93	100	94	79	76	87	82	76	65	-	-	94	87	-	-
450	89	98	-	99	89	82	95	89	83	69	-	-	99	93	-	-
480	95	100	-	-	97	90	100	97	91	79	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup> BDA = batata-dextrose-ágar

<sup>2</sup> Ágar = ágar-ágar

\* Dados registrados no período de 30 a 90 minutos não são apresentados já que os esporos começaram a germinar a partir de 120 minutos.

ção feita ao isolamento 84-Tut-3 que apresentou crescimento gradual até o terceiro dia, atingindo o máximo crescimento diário entre o terceiro e quinto dias e decrescendo a partir do quinto dia após a semeadura (Fig. 1).

Culturas puras do patógeno só foram obtidas quando esporos foram semeados previamente em ágar-água por 120 min. Culturas a partir de porções de tecidos infectados ou de esporos exsudados sobre lesões estavam sempre associadas a contaminantes, principalmente, *Fusarium decemcelulare*, *Beltrania rhombica*, *Gliocladium* sp. e *Pestalotia* sp..

Os sintomas da antracnose só foram reproduzidos quando mudas de guaraná foram inoculadas entre 9:00 e 11:00 h (Fig. 2). Ao estudar o mecanismo de abertura dos

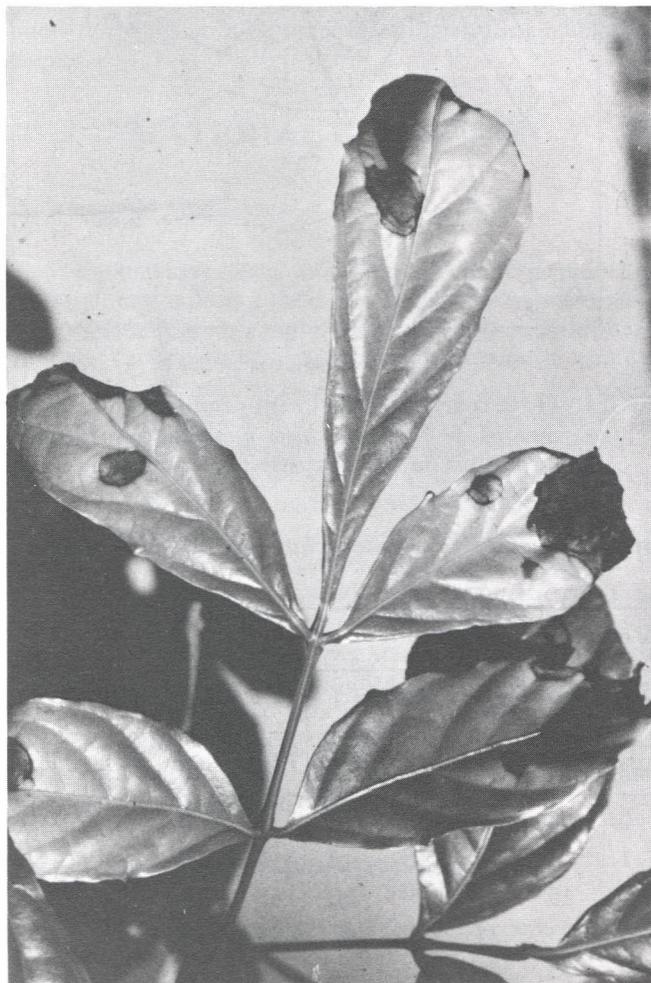


FIG. 2 - Folíolos de guaranzeiros com sintomas característicos da antracnose, cinco dias após a inoculação.

estômatos de folhas de guaranzeiro, Reis (1978) observou que nesse período as células-guarda atingiam o máximo de abertura. Esse fato pode ter proporcionado condições para que os esporos do fungo penetrassem mais facilmente nos

tecidos da planta. Subha Rao (1985) também notou uma correlação positiva entre abertura estomatal de *Curcuma longa* e a incidência de mancha foliar causada por *Colletotrichum capsici*, principalmente nas cultivares mais suscetíveis. Das cepas inoculadas somente 82-97-D, 84-Tut-1, 84-Tut-2 e 84-Mad-2 induziram sintomas nas plantas inoculadas, entretanto, o fato dos demais isolamentos não terem induzido sintomas pode estar relacionado com a reação das plantas inoculadas já que foram usadas plantas oriundas de uma mistura de matrizes. A manutenção das plantas em câmara úmida por pelo menos 72 horas é essencial na manifestação dos sintomas já que plantas inoculadas nas mesmas condições mas, sem o uso da câmara úmida não exibiram sintomas característicos da doença. A importância da umidade no desenvolvimento da doença já tinha sido observada por Duarte *et al.* (1981). Os autores constataram que os picos de incidência da antracnose eram sempre precedidos por dias de chuva.

A caracterização em raças fisiológicas não pôde ser feita devido à inexistência de cultivares fixadas de guaraná que pudessem ser usadas como hospedeiras diferenciais. As cepas patogênicas foram isoladas de lesões negras e de evolução rápida, formadas em folíolos jovens. O rápido desenvolvimento das lesões parece estar relacionado com a alta virulência do patógeno e com a idade do tecido da planta.

Os resultados obtidos sugerem a existência de variabilidade para virulência dentro de *C. guaranicola* e a ocorrência de patótipos dentro da população de guaranzeiros ainda não caracterizados como raças fisiológicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, F.C. Antracnose do guaraná. Belém, IPEAN, 1960. 37p. (IPEAN. Boletim técnico, 40).
- DUARTE, M.L.R. & ALBUQUERQUE, F.C. Fisiologia de *Colletotrichum guaranicola* - Efeito de meios de cultura e regime de luz na esporulação. In: Simpósio do Trópico Úmido, 1<sup>o</sup> (v. IV - Cultivos Perenes), Belém, 1986. Anais... Belém, EMBRAPA, 1986. p. 339-342.
- DUARTE, M.L.R.; CORRÊA, M.P.F. & ALBUQUERQUE, F.C. Epidemiologia da antracnose do guaranzeiro - Freqüência de ocorrência em diferentes sistemas de produção. Fitopatol. bras. 6: 606, 1981.
- PIO-RIBEIRO, G. & CHAVES, G.M. Estudos sobre a variabilidade de isolamentos e culturas monospóricas de *Colletotrichum lidemuthianum* (Sacc. et Man.) Scrib. Experientiae 19: 1-71, 1975.
- REIS, G.G. Estudos fisiológicos na planta de guaraná. II. Movimento dos estômatos. Relatório Anual do CPATU, Belém, 1978. p. 102-103.
- SUHA RAO, I.V. Stomatal opening and incidence of *Colletotrichum* leaf spot disease in turmeric cultivar. Cocoa, Arecanut & Spices Journal 8: 97-99, 1985.