
ESTUDO COMPARATIVO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E FISIOLÓGICAS DE DOIS ISOLAMENTOS DE *CORYNESPORA CASSIICOLA*

M.L.R. DUARTE¹, S. ASANO² & F.C. ALBUQUERQUE¹

¹Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Úmido (CPATU)
Caixa Postal 48, 66.000, Belém, PA; ²Estação Experimental
do PLANALSUCAR, Castanhal, PA

(Aceito para publicação em 19/10/82)

RESUMO

O fungo *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt) Wei é de ocorrência freqüente em diferentes hospedeiros, entre os quais mamoeiro e cacaueteiro. Estes isolamentos apresentam diferenças marcantes quanto ao crescimento vegetativo em meio de cultura batata-dextrose-ágar.

Diferenças morfológicas, fisiológicas e patogênicas foram detectadas através de vários ensaios em laboratório e casa-de-vegetação.

Foram observadas variações no comprimento, largura e número de septos dos conídios e conidióforos, em ambos os isolamentos. O do mamoeiro apresentou sempre maiores dimensões que o do cacaueteiro. A velocidade de crescimento foi maior no do mamoeiro, pois 120 horas após a inoculação do meio de cultura apresentou um crescimento radial médio de 48mm, enquanto que no do cacaueteiro o crescimento radial médio alcançou 27mm, em igual período. Entre os meios de cultura testados batata-dextrose-ágar em escuro contínuo favoreceu o crescimento radial do isolamento do cacaueteiro, enquanto que batata-dextrose-ágar + 1% de extrato de levedura, em luz contínua, favoreceu a esporulação. O isolamento do mamoeiro apresentou maior crescimento radial quando cultivado em Czapek Dox e em regime contínuo de escuro.

Este isolamento esporulou bem em meio de Czapek Dox, tanto em luz como em escuro contínuos. Ambos os isolamentos mostraram diferenças na manifestação de sintomas em diferentes hospedeiros.

ABSTRACT

**Comparative study of Physiologic and morphologic characteristics of two
Corynespora cassiicola isolates**

Corynespora cassiicola (Berk & Curt) Wei occur frequently in different hosts such as papaya and cocoa plants. Conspicuous differences in relation to vegetative growth in potato-dextrose-agar culture medium were observed.

Morphologic, physiologic and pathogenic differences were detected through several assays carried out in the laboratory and the greenhouse.

Variations in length, width and number of septa of conidia, and conidiophorus were observed in both isolates. The growth rate was greater in papaya isolate than cocoa isolate. While in cocoa isolate, the radial growth reached 27mm, in 120 hours after inoculation of culture media, papaya isolate attained 48mm of growth during the same period. Among the culture media tested potato-dextrose-agar in continuous dark period, favored the radial growth of cocoa isolate, while potato-dextrose-agar + 1% yeast extract in continuous light period favored the sporulation. The papaya isolate showed greater growth when cultivated in Czapek Dox medium in continuous dark period. This isolate produced greater spore number in Czapek Dox medium in dark as well as continuous light period. Both isolates showed differences in symptoms in different hosts.

INTRODUÇÃO

O fungo *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt) Wei afeta vários hospedeiros, entre os quais caupi, mamoeiro, cacauieiro, seringueira, juta, além de plantas nativas onde causa manchas foliares, em plantas adultas e em mudas mantidas em viveiro.

Em mamoeiro, o patógeno causa manchas circulares com 0,3 a 0,5 mm de diâmetro, com centro branco acinzentado e bordas de cor amarela tênue, distribuídas pelos lóbulos foliares. Em mudas ainda em viveiro provoca manchas necróticas, queda das folhas e lesões nas hastes. A doença em cacauieiro foi descrita recentemente por Duarte et al (1978) e caracteriza-se pela formação de manchas de cor parda, irregulares, angulosas com centro de cor branca cinza e margem parda escura nítida, envolvidas por um halo amarelo tênue, tanto em mudas mantidas em viveiro como em plantas adultas, em condições de campo.

Durante o exame de lesões formadas

nestes hospedeiros, sob a binocular, observou-se que as estruturas reprodutivas eram formadas mais na face ventral das folhas de mamoeiro e em ambas as faces, nas folhas de cacauieiro. Além disso, quando cultivados em batata-dextrose-ágar, estes isolamentos apresentavam variações quanto à velocidade de crescimento e à coloração das colônias.

Visando a detectar diferenças morfológicas e fisiológicas entre estes isolamentos e a capacidade de infectar diferentes hospedeiros, foram conduzidos ensaios em condições de laboratório e de ripado, nas dependências do Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Úmido (CPATU), em Belém, Pará.

No presente trabalho são apresentados e discutidos os resultados dos ensaios, cujos objetivos foram selecionar meios de cultura capazes de favorecer o crescimento e esporulação em regimes contínuos de luz ou escuro, verificar diferenças quanto à velocidade de crescimento e à especificidade de hospedeiros, através de inoculações cruzadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtiveram-se culturas puras do patógeno, transferindo-se com escalpelo, esporos formados em lesões foliares em mamoeiro e cacaueiro para tubos de ensaio contendo BDA (batata 200 g, dextrose 20 g, ágar 20 g).

– Influência do tempo de incubação no crescimento radial

Discos de colônias, com 4 mm de diâmetro, foram retirados da zona de crescimento ativo de colônias dos dois isolamentos, transferidos para placas de Petri contendo 20 ml de BDA e submetidos a diferentes tempos de incubação. Após a transferência dos discos das colônias para o meio de cultura, as placas foram mantidas em um regime alternado de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Foram feitas mensurações do crescimento radial dos dois isolamentos, nos períodos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas, expressas em milímetros.

– Estudo comparativo das estruturas reprodutivas

Foram obtidas culturas monospóricas dos dois isolamentos. Após o desenvolvimento das colônias, discos de 4 mm retirados da zona de crescimento ativo foram transferidos para placas de Petri contendo BDA. Quinze dias após, época em que as colônias cobriram toda a superfície dos meios de cultura, usando-se a lente micrométrica, fizeram-se as mensurações das seguintes estruturas: comprimento, largura e número de septos dos conídios e conidióforos, dimensões da escara dos esporos e da célula-pé dos conidióforos. Foram feitas 800 mensurações para cada um dos isolamentos.

– Influência de diferentes meios de cultura e do regime de luz no crescimento e esporulação.

Após a distribuição dos diferentes meios de cultura, estes foram inoculados com discos de 4 mm de diâmetro retirados de colônias com 10 dias de idade, desenvolvidas

em BDA. Foram testados os meios de cultura BDA Lev (batata 200 g, dextrose 20 g, ágar 20 g, extrato de levedura 1 g), Czapek Dox (NaNO_3 2g; KH_2PO_4 1g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g; KCl 0,5g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01g; sucrose 30 g; ágar 15 g), Folhas de cacau-ágar (decoção de 50 g de folhas de cacaueiro; ágar 20g) e Folhas de mamão-ágar (decoção de 50g de folhas de mamoeiro; ágar 20g). Instalaram-se dois experimentos. No primeiro, as placas de Petri, inoculadas com os dois fungos, foram submetidas à luz contínua de duas lâmpadas fluorescentes tipo "Day Light", de 40 watts e à distância de 40 cm; no outro, as placas de Petri foram envolvidas com papel alumínio tipo Rochedo. O delineamento experimental usado foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e seis repetições. Cada placa de Petri constituiu uma repetição. As mensurações do crescimento radial das colônias dos isolamentos foram tomadas dez dias após. A produção de esporos também foi avaliada, fazendo-se uma suspensão de esporos de cada uma das repetições. Para isso, adicionaram-se 3 ml de água destilada estéril, na superfície de cada uma delas e, com um pincel pelo de marta nº 10, fez-se a retirada dos esporos, tendo-se o cuidado de eliminar o excesso de micélio. A fim de matar os esporos, adicionou-se em seguida, em cada uma das suspensões de esporos, uma gota de bicloreto de mercúrio 1:1000. A contagem do número de esporos nas suspensões foi feita com a câmara de Neubauer e, para efeito do cálculo da concentração, usou-se a fórmula proposta por Tuite (1969) para esporos grandes.

RESULTADOS

– Influência do tempo de incubação no crescimento radial

Na Figura 1, observa-se que o isolamento do mamoeiro apresentou maior velo-

cidade de crescimento que o do cacauero, nos diferentes períodos de incubação. Esta velocidade de crescimento ocorreu nas se-

guintes taxas: 1:1,40; 1:1,99; 1:2,21; 1:1,98 e 1:1,81 nos períodos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas, respectivamente.

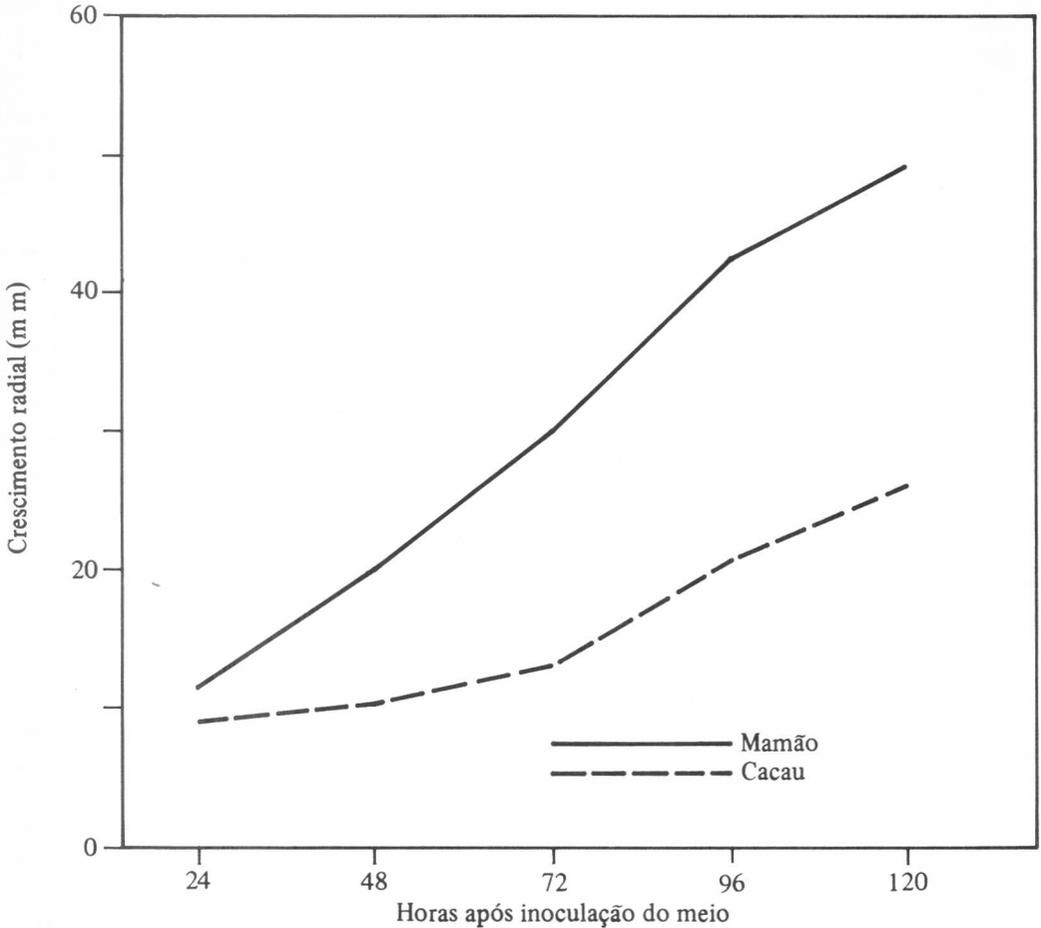


Fig. 1. Crescimento radial (mm) de *C. cassicola* isolado do mamoeiro e cacauero em diferentes períodos de incubação.

— Estudo comparativo das estruturas reprodutivas

Os dois isolamentos apresentaram variações quanto às dimensões dos conídios e conidióforos, quando cultivados em meio de

cultura BDA (Tabela 1). O isolamento do mamoeiro apresentou sempre dimensões maiores que o do cacauero, entretanto, de acordo com as dimensões propostas para a espécie (Wei, 1950) parecem pertencerem a mesma espécie.

Tabela 1 — Dimensões das estruturas de *C. cassiicola* isolado do mamoeiro e cacauero, observadas quinze dias após o cultivo em meio de cultura batata dextrose-água.

ESTRUTURAS ^a	<i>C. cassiicola</i> mamoeiro		<i>C. cassiicola</i> cacauero	
Conídio				
— comprimento	28 μ	a 200 μ	32 μ	a 180 μ
— largura	8 μ	a 12 μ	4 μ	a 8 μ
— nº de septos	2 μ	a 14 μ	2 μ	a 9 μ
— escara	4 μ	a 6 μ	2 μ	a 4 μ
Conidióforo				
— comprimento	60 μ	a 200 μ	60 μ	a 192 μ
— largura	2 μ	a 12 μ	4 μ	a 8 μ
— nº de septos	2 μ	a 11 μ	3 μ	a 8 μ
— célula-pé	2 μ x 4 μ	— 60 μ x 20 μ	12 μ x 8 μ	— 24 μ x 8 μ

^a/ Média de 200 mensurações.

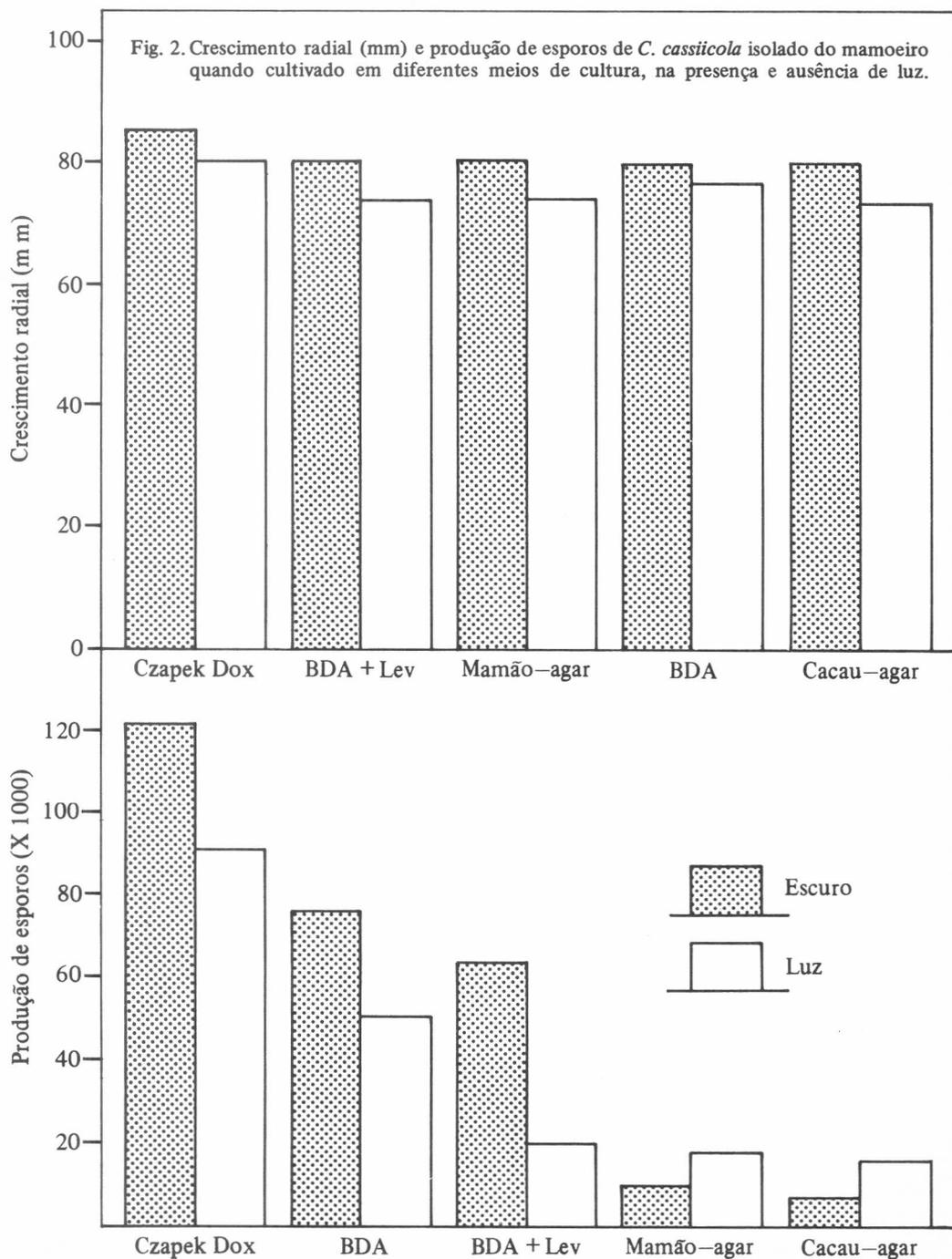
— Influência de diferentes meios de cultura e do regime de luz no crescimento e esporulação

Entre os meios de cultura testados, Czapek Dox foi o que mais favoreceu a esporulação do isolamento do mamoeiro seguido da BDA e BDA + 0,1% de extrato de levedura, em regime de escuro contínuo. Quanto ao crescimento radial, Czapek Dox foi ligeiramente superior quando comparado aos demais. (Fig. 2). O isolamento do cacauero esporulou bem em BDA + 0,1% de extrato de levedura, seguido de Czapek Dox, quando as culturas permaneceram em regime de luz contínua. Em relação ao crescimento radial os meios de cultura que proporcionam melhores condições para o crescimento foram BDA, Czapek Dox e BDA + 0,1% de extrato de levedura em regime de escuro contínuo. Estes meios de cultura foram ligeiramente superiores aos demais (Fig. 3)

O meio de cultura que menos favoreceu a esporulação do isolamento do mamoeiro foi a decocção de folhas de cacauero — água, tanto em luz como em escuro contínuos. Quanto ao crescimento radial, este meio de cultura foi ligeiramente inferior aos demais, em regime de escuro contínuo. Na presença de luz, sua capacidade de promover um bom crescimento radial é comparável aos meios de cultura BDA + 0,1% de extrato de levedura e decocção de folhas de mamoeiro-água.

Em relação ao isolamento do cacauero, o meio de cultura que menos favoreceu a esporulação foi o BDA, na ausência de luz, embora o maior crescimento radial tenha sido observado nas colônias desenvolvidas neste meio de cultura (Fig. 3).

Os dados sobre a interação meios de cultura e luminosidade revelaram que o isolamento do mamoeiro esporulou bem, tanto



em luz quanto em escuro contínuos, havendo uma tendência para melhor esporulação e crescimento radial em escuro contínuo. O isolamento do cacauero cresceu melhor quando submetido ao regime de escuro contínuo embora a esporulação tenha sido favorecida na presença de luz, a exceção do meio de cultura de cocção de folhas de mamoeiro-ágar onde a ausência de luz induziu maior esporulação (Fig. 3).

Observou-se que os isolamentos apresentaram diferenças quanto à necessidade de luz para crescerem o esporularem. O isolamento do mamoeiro cresceu bem tanto em luz como em escuro contínuo, enquanto que a esporulação foi maior em escuro contínuo quando o patógeno foi cultivado nos meios Czapek Dox, BDA e BDA + 0,1% de extrato de levedura. Nos meios de cultura decocção de folhas de mamoeiro e de cacauero-ágar, a presença de luz induziu maior esporulação. O isolamento do cacauero cresceu melhor em escuro contínuo necessitando de luz contínua para produzir maior quantidade de esporos.

— Avaliação da capacidade patogênica dos isolamentos através de inoculações cruzadas

Nas plantas de caupi, seringueira, mamoeiro e cacauero inoculadas com os dois isolamentos de *C. cassicola*, foram observadas variações quanto aos sintomas.

Mudas de mamoeiro inoculadas com o isolamento do mamoeiro exibiram pontos descoloridos nas folhas. Esta descoloração tornou-se mais acentuada seis dias após a inoculação, observando-se ainda queda de folhas. Quando as nervuras eram afetadas o lóbulo foliar quebrava no ponto afetado. Oito dias após as áreas descoloridas tornaram-se encharcadas, depois necróticas, próximas da nervura. Foi notada abundante esporulação nas lesões formadas na face inferior

das folhas. Nos pecíolos surgiram lesões negras, alongadas, deprimidas. Nas plantas inoculadas com o isolamento do cacauero surgiram áreas de tecido descolorido, assemelhando-se à reação de hipersensibilidade.

Em caupi inoculado com o isolamento do mamoeiro ocorreu amarelecimento e queda de folhas, entretanto os sintomas de lesões pardas, circulares e com anéis concêntricos provocadas pelo fungo neste hospedeiro não foram observadas. O isolamento do cacauero não provocou sintomas nas plantas de caupi.

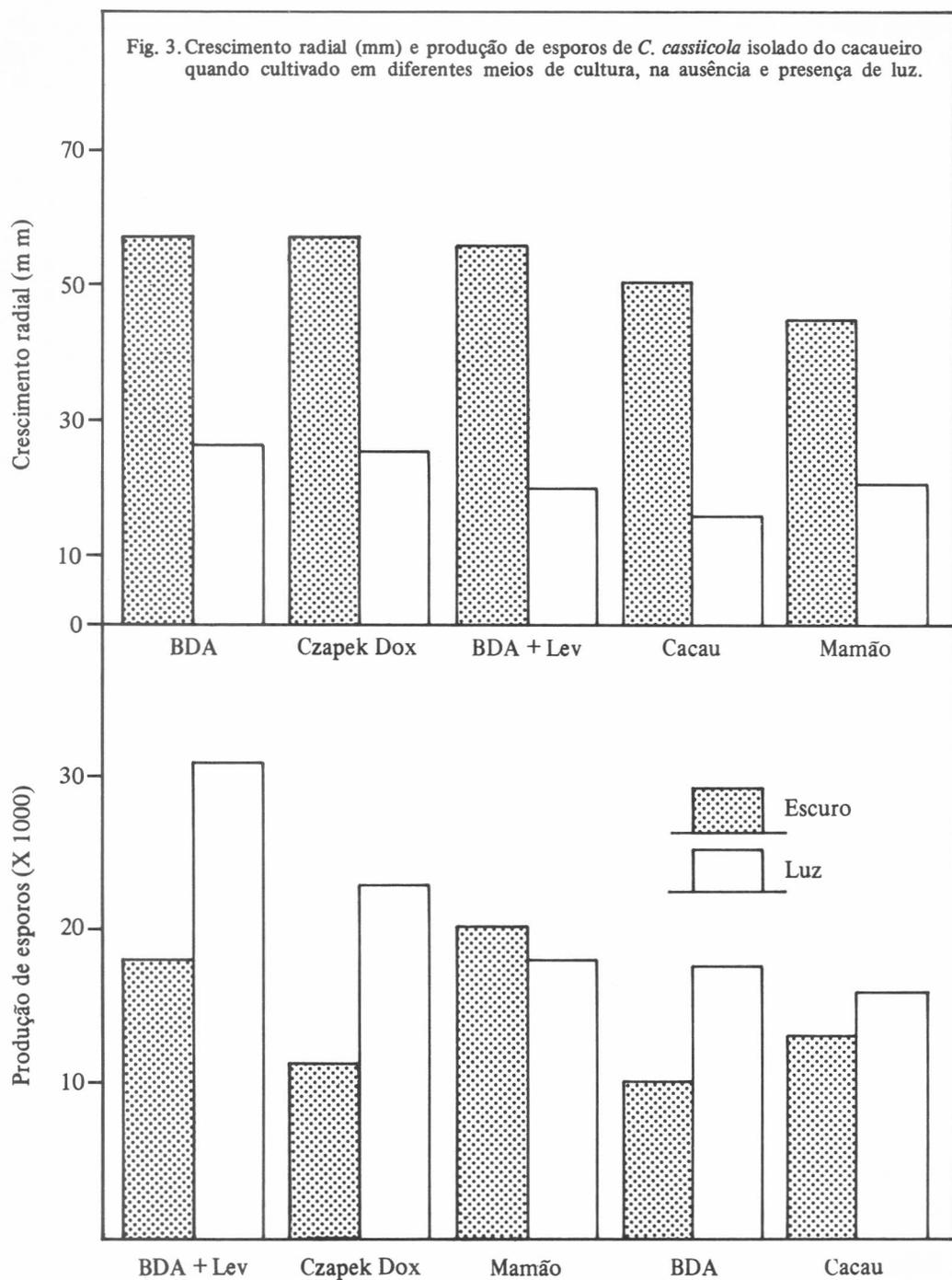
Plantas de seringueira inoculadas com o isolamento do mamoeiro apresentaram inicialmente pontuações cloróticas, mal formação foliar, quando a penetração do fungo ocorreu próximo às nervuras e lesões necróticas. As plantas inoculadas com o isolamento do cacauero não manifestaram sintomas.

Mudas de cacauero inoculadas com o isolamento do mamoeiro não exibiram sintomas, entretanto naquelas inoculadas com o isolamento do cacauero surgiram lesões angulosas, necróticas, características da doença neste hospedeiro.

DISCUSSÃO

O estudo das características morfológicas e fisiológicas de *Corynespora cassicola* (Berk. & Curt.) Wei isolado do mamoeiro e cacauero revelou diferenças quanto ao crescimento radial e produção de esporos em diferentes meios de cultura e regimes contínuos de luz e escuro, assim como, em relação à patogenicidade em mudas de mamoeiro cultivar Solo, cacauero híbrido, caupi cultivar IPEAN V-69 e seringueira.

Os isolamentos apresentaram variações nas dimensões de comprimento, largura e número de septos dos conídios e conidióforos, entretanto estas variações estão dentro



das dimensões citadas para a espécie (Wei, 1950).

Awoderu (1969) fazendo um estudo comparativo entre três isolamentos do fungo sendo dois de seringueira de Kuala Lumpur e Sierra Leone e um de mamoeiro de Sierra Leone também observou diferenças nas dimensões das estruturas reprodutivas. Entretanto estas diferenças não foram suficientes para que os isolamentos estudados fossem considerados espécies diferentes.

Os dados da literatura não se referem às diferenças na velocidade de crescimento. No presente trabalho, quando se estudou este parâmetro, observou-se que o isolamento do mamoeiro teve maior capacidade para desenvolvimento em BDA do que o do cacauero (Fig. 1).

A produção abundante de esporos nos meios de cultura Czapek Dox e BDA+0,1% de extrato de levedura observada no isolamento do mamoeiro e cacauero, respectivamente, estão em concordância com os resultados obtidos por Awoderu (1969). Em BDA os dois isolamentos apresentaram um bom crescimento radial, entretanto, o número de esporos formados neste meio de cultura foi inferior ao daqueles formados em Czapek Dox e BDA + 0,1% de extrato de levedura. Estas diferenças não foram suficientes para que os isolamentos estudados fossem considerados espécies diferentes. O aumento da produção de esporos verificado no isolamento do cacauero quando cultivado em BDA + 0,1% de extrato de levedura quando comparado com BDA sugere que este isolamento necessita de um fator de crescimento para estimular a esporulação, provavelmente ácido nicotínico ou riboflavina presentes no extrato de levedura (Anônimo, 1976). Um baixo índice de esporulação do isolamento de *C. cassiicola* da soja cultivada em BDA também foi observado por

Almeida & Yamashita (1976). Estes autores verificaram que seu isolamento esporulou mais em escuro contínuo parecendo assemelhar-se ao isolamento de mamoeiro.

As condições de luz e escuro a que foram submetidos os dois isolamentos tiveram influência no crescimento radial e esporulação. Enquanto o isolamento do mamoeiro cresceu ligeiramente melhor em escuro contínuo e esporulou bem na mesma condição de luminosidade, exceção feita aos meios decocção de folhas de mamoeiro e cacauero-ágar, o do cacauero cresceu melhor quando as colônias foram mantidas em escuro contínuo. Já a esporulação foi favorecida pela presença de luz contínua.

Embora os isolamentos não tenham apresentado diferenças quanto à morfologia o mesmo não ocorreu quando a capacidade patogênica foi testada. Os testes de inoculação cruzada revelaram a existência de variação entre os dois isolamentos quanto à capacidade de infectarem hospedeiros comuns. O isolamento do mamoeiro incitou lesões em mamoeiro, caupi e seringueira, mas, não em cacauero, enquanto que o do cacauero quando inoculado em mamoeiro incitou lesões brancas semelhantes àquelas verificadas quando ocorre reação de hipersensibilidade. Este isolamento induziu lesões características da doença no cacauero mas não infectou caupi nem seringueira.

Olive et al (1945) fazendo um estudo comparativo entre um isolamento do caupi e um da soja verificaram que apesar dos isolamentos não mostrarem diferenças marcantes nas estruturas reprodutivas, diferenças na manifestação dos sintomas foram observadas o que permitiu aos autores identificá-los como raça 1 (caupi) e raça 2 (soja). Spencer & Walters (1969) trabalhando com 14 isolamentos diferentes de *C. cassiicola* observaram diferenças morfológicas,

culturais e patogênicas entre estes isolamentos. Os autores também confirmaram a existência de duas raças do patógeno.

Desde que o patógeno em mamoeiro é classificado como *C. cassicola* (Frossard, 1969, Bird et al. 1966) e que o iso-

lamento do cacauero foi identificado pelo Dr. Ellis do Commonwealth Mycological Institute como *C. cassicola* (Duarte et al. 1978), as diferenças na capacidade de infectar diferentes hospedeiros sugerem a existência de duas raças do patógeno afetando o mamoeiro e o cacauero no Estado do Pará.

LITERATURA CITADA

- ALMEIDA, A.M.R. & YAMASHITA, J. Crescimento e esporulação de *Corynespora cassicola* (Berk. & Curt.) Wei em diferentes meios de cultura. *Fitopatologia Brasileira* 1(3): 203-206, 1976.
- ANÔNIMO. The Oxoid manual of culture media, ingredients and other laboratory services. Oxoid Limited. Third Edition. Basingstoke, 296p. 1976.
- AWODERU, V.A. A new leaf spot of Pará rubber (*Hevea brasiliensis*) in Nigeria. *Plant Disease Repr.* 53(5): 406-408, 1969.
- BIRD, J.; KROCHMAL, A.; ZENTMYER, G. & ADSUAR, J. Fungus diseases of papaya in the U.S. Virgin Islands. *Journal of Agriculture of University of Puerto Rico* 50: 186-200, 1966.
- DUARTE, M.L.R.; ALBUQUERQUE, F.C. & PRABHU, A.S. Uma nova enfermidade do cacauero (*Theobroma cacao* L.) causada pelo fungo *Corynespora cassicola* (Berk. & Curt.) Wei. *Fitopatologia Brasileira* 3(3): 259-265, 1978.
- FROSSARD, P. Les maladies du papayer — Les maladies fongiques. *Fruits* 24(11-12): 473-481, 1969.
- OLIVE, L.S., BAIN, D.C. & LEFERVRE, C.L. A leaf spot of cowpea and soybean caused by an undescribed species of *Helminthosporium*. *Phytopathology* 35: 822-31, 1945.
- SPENCER, J.A. & WALTERS, H.J. Variations in certain isolates of *Corynespora cassicola*. *Phytopathology* 59 (1): 58-60, 1969.
- TUITE, J. **Plant pathological methods**. Minneapolis, Burgess Publishing, 239p. 1969.
- WEI, C.T. Notes on *Corynespora*. Kew, Surrey, 10p. Commonwealth Mycological Institute, 1950. (Mycological papers, 34).