

## Meio semiseletivo para recuperação e quantificação de *Cryptosporiopsis perennans* em maçãs

### Semi-selective medium for recovery and quantification of *Cryptosporiopsis perennans* from apple fruits

Piérri Spolti<sup>I</sup> Rosa Maria Valdebenito-Sanhueza<sup>II</sup> Emerson Medeiros Del Ponte<sup>I</sup>

#### - NOTA -

#### RESUMO

A podridão “olho de boi”, causada pelo fungo *Cryptosporiopsis perennans*, é uma das doenças de pós-colheita da macieira mais importantes no Brasil. Os objetivos deste trabalho foram desenvolver e avaliar um meio semiseletivo para a recuperação e mensuração da população epífita de *C. perennans* em maçãs “Fuji”. A suplementação de BDA com tetraciclina, nistatina e iprodiona, nas respectivas concentrações de 12,5; 1 e 1 µg p.a mL<sup>-1</sup>, proporcionou o desenvolvimento de colônias de *C. perennans* estatisticamente igual ( $P > 0,05$ ) ao observado no meio BDA. Em condições de infecção natural e em amostras pré-inoculadas com *C. perennans*, o meio semiseletivo permitiu detectar e quantificar a população do fungo na superfície dos frutos, além de ter inibido o crescimento de fungos leveduriformes, dematiáceos e leveduras. Em lavagens de frutos previamente inoculados, o número de conídios recuperados com o meio semiseletivo apresentou correlação ( $r = 0,88$ ;  $P < 0,05$ ) com a concentração do inóculo aspergido sobre os frutos.

**Palavras-chave:** podridão “olho de boi”, antibióticos, fungicidas.

#### ABSTRACT

Bull's eye rot, caused by *Cryptosporiopsis perennans*, is one of the most important apple's posharvest diseases in Brazil. The aim of this research was to develop and evaluate a semi-selective media to recovery and quantification of the epiphytic population of *C. perennans* on the apple fruit surface. A PDA medium amended with tetracycline, nistatine and iprodione in concentrations of 12.5; 1 and 1 µg i.a.mL<sup>-1</sup>, respectively, allowed the development of *C. perennans* colonies statistically similar ( $P > 0.05$ ) to those in PDA media. Nistatine concentrations higher than 1 µg.mL<sup>-1</sup> inhibited the growth of

the pathogen. Under natural infection conditions and pre-inoculation with *C. perennans*, the media allowed the detection and quantification of the fungal population on the fruit surface without affecting *C. perennans* development. Number of conidia observed in pre-inoculated fruits was correlated ( $r = 0.88$ ;  $P < 0.05$ ) to inoculum concentration sprayed on the fruit surface.

**Key words:** bull's eye rot, apple, antibiotics, fungicides.

As doenças podridão “olho de boi” (POB) em frutos e cancro de ramos da macieira, ambas causadas pelo fungo *Cryptosporiopsis perennans* (Zeller & Childs) Wollenw. (Kienholz, 1939) [teleomorfo *Neofabreae perennans* Kienholz; sin. *Pezizula perennans* (Kienholz Dugan, R.G. Roberts & G.G. Grove)], foram descritas no Brasil, em 1996, e atualmente encontram-se disseminadas em todas as regiões produtoras de maçã do Rio Grande do Sul, de Santa Catarina e do Paraná (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2002).

No Brasil, na ausência de medidas de controle, danos superiores a 18% das maçãs refugadas durante a etapa de processamento foram relatados por decorrência da POB, cuja ocorrência na fase de pré-colheita é restrita a frutos com ferimentos (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2002).

Apesar de reconhecida a importância de meios semiseletivos em estudos epidemiológicos, são escassas informações na literatura para muitos

<sup>I</sup>Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 90001-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>II</sup>Proterra Consultoria Agrônômica Ltda., Vacaria, RS, Brasil. E-mail: rosamaria@m2net.com.br. Autor para correspondência.

patógenos (AMIRI et al., 2009). GROVE et al. (1992), estudando a esporulação de *C. perennans* em cancos desenvolvidos a partir de inoculações artificiais, utilizaram um meio semiseletivo contendo triforine, terrazole, estreptomomicina e oxitetraciclina. No Brasil, MAFFIOLETI (2007) utilizou BDA acidificado (pH 4,5) no isolamento de *C. perennans* a partir de tecidos de macieiras. Em ambos os casos, os autores não documentaram as vantagens dos meios em relação ao meio de cultura sem suplementação. Assim, os objetivos deste trabalho foram formular e avaliar a sensibilidade de um meio semiseletivo para *C. perennans*, por meio do ajuste de concentrações de substâncias inibidoras de microrganismos contaminantes comuns em tecidos da macieira, em níveis não inibitórios ao crescimento das colônias do patógeno-alvo.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Estação Experimental de Fruticultura Temperada da Embrapa Uva e Vinho, em Vacaria, Rio Grande do Sul (RS), com um isolado monospórico de *C. perennans* (CNPUV/Va-5) obtido de fruto, o qual, em estudo prévio, mostrou baixa taxa de crescimento micelial quando comparado a outros oitos isolados do fungo (BOGO et al., 2008). Diversos meios foram formulados, em dois ensaios sequenciais,

com dois antibióticos (tetraciclina como inibidor de bactérias e nistatina para leveduras) e um fungicida (iprodiona) efetivo contra fungos dematiáceos epífitos associados aos tecidos de macieira. Assim, os dois ensaios, com diferentes combinações de inibidores, foram conduzidos utilizando-se o meio BDA (ágar 1,8%; dextrose 1,0%; caldo de batata 2%) modificado e suplementado conforme o tratamento (Tabela 1) (PHILLIPS & HARVEY, 1975). Uma alíquota de 100µL de uma suspensão de conídios de *C. perennans* (102conídios mL<sup>-1</sup>), ajustada com auxílio de um hemocítmetro, foi distribuída sobre os diferentes meios em placas de Petri e incubadas a 22°C, com fotoperíodo de 12h. As variáveis analisadas foram número e tamanho das colônias de *C. perennans*, obtido com duas medições perpendiculares das colônias realizadas com auxílio de paquímetro digital aos sete e 14 dias de incubação. Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com três repetições (placas). O número de colônias foi transformado para log<sub>v</sub>X+10, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (P<0,05).

O meio BDATNI (Tabela 1) selecionado nos ensaios anteriores foi avaliado quanto à eficiência de isolamento de *C. perennans*. A partir de uma amostra

Tabela 1 - Descrição e composição dos meios de cultura avaliados para o desenvolvimento de *Cryptosporiopsis perennans*, sendo avaliados em tais meios o número e tamanho das colônias e tendo por padrão o meio BDA.

Meio de cultura	pH do meio <sup>1</sup>	Tetraciclina (µg p.a mL <sup>-1</sup> )	Nistatina (µg p.a mL <sup>-1</sup> )	Iprodiona (µg p.a mL <sup>-1</sup> )
-----Meios avaliados no 1º ensaio <sup>3</sup> -----				
BDA <sup>2</sup>	7,0	0,0	0,0	0,0
BDAT	7,0	12,5	0,0	0,0
BDATN	7,0	12,5	25,0	0,0
BDATNI <sub>1</sub>	7,0	12,5	25,0	1,0
BDATNI <sub>2</sub>	7,0	12,5	25,0	2,0
BDA4,5 <sup>2</sup>	4,5	0,0	0,0	0,0
BDA4,5T	4,5	12,5	0,0	0,0
BDA4,5TN	4,5	12,5	25,0	0,0
BDA4,5TNI <sub>1</sub>	4,5	12,5	25,0	1,0
BDA4,5TNI <sub>2</sub>	4,5	12,5	25,0	2,0
-----Meios avaliados no 2º ensaio <sup>3</sup> -----				
BDATI	7,0	12,5	0,0	1,0
BDATNI	7,0	12,5	1,0	1,0
BDATN <sub>5</sub> I	7,0	12,5	5,0	1,0
BDATN <sub>10</sub> I	7,0	12,5	10,0	1,0
BDATN <sub>15</sub> I	7,0	12,5	15,0	1,0

<sup>1</sup> BDA<sub>4,5</sub> = Ajuste do pH com ácido láctico 85%; T=tetraciclina; N=nistatina; I=iprodiona com a concentração dos inibidores descritos na tabela. <sup>2</sup> Meios de cultura utilizados em ambos os ensaios. <sup>3</sup> Ensaios sequenciais utilizados para a pré-seleção do meio a ser utilizado na recuperação de *Cryptosporiopsis perennans*, tendo por critério a capacidade de manter o desenvolvimento das colônias de forma equivalente (P>0,05) ao apresentado em meio BDA. Os resultados do primeiro ensaio foram utilizados para a definição da seleção dos meios a serem testados no segundo.

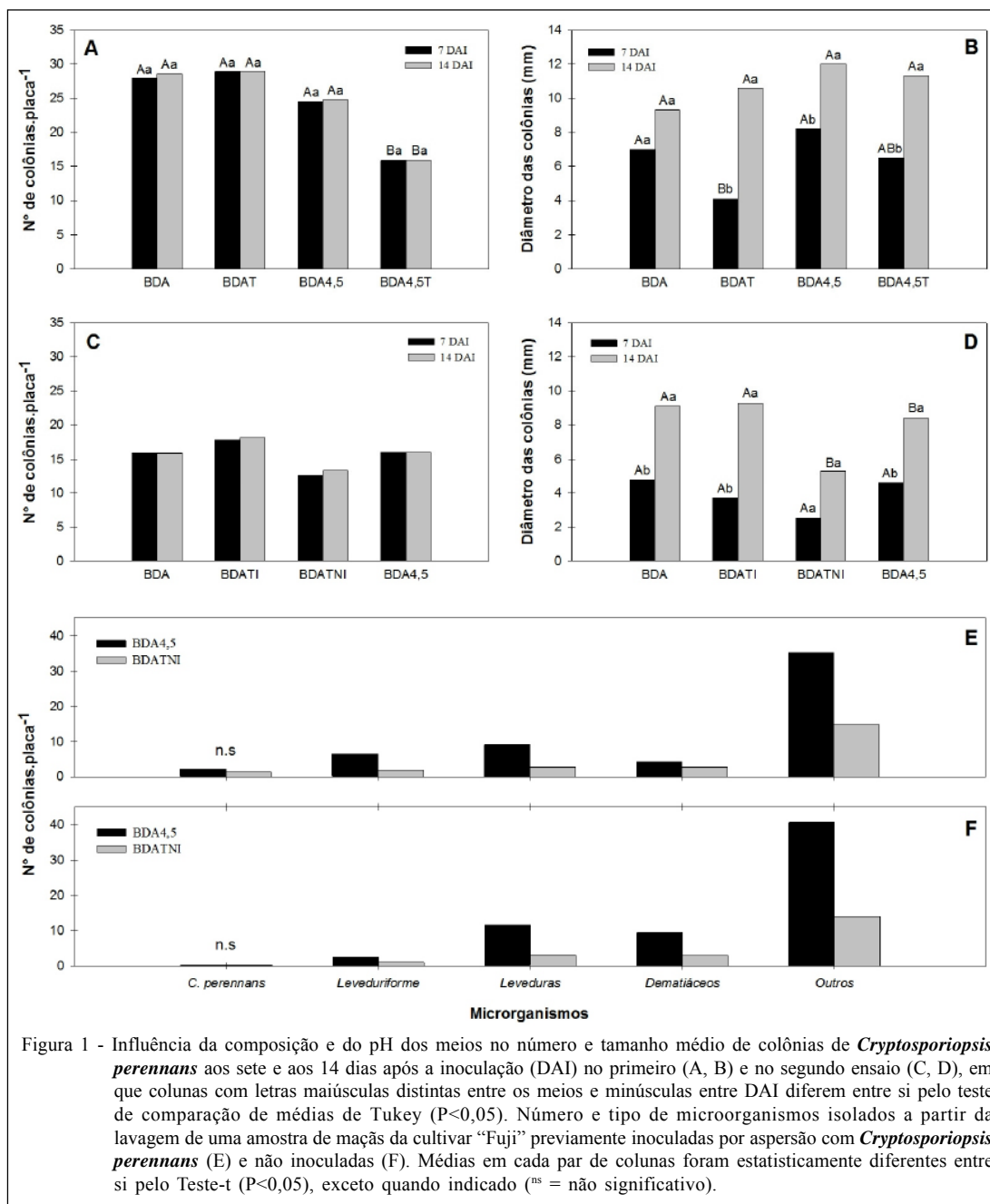
de oito maçãs “Fuji”, assintomáticas e coletadas no campo e sem tratamentos prévios, dois grupos de quatro maçãs foram inoculadas por aspersão com uma suspensão de  $10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  de *C. perennans*. Após secos em fluxo laminar, os frutos foram imersos em 400mL de água destilada esterilizada (ADE) e adicionada de Tween 0,001% e expostos à sonicação por um minuto. Amostras da suspensão foram distribuídas em placas de Petri contendo BDA acidificado ou meio semiseletivo selecionado do experimento anterior. O mesmo procedimento foi conduzido com frutos não inoculados. Após 15 dias de incubação a  $22^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12h, o número de colônias de *C. perennans* e o número e o tipo de agentes contaminantes (fungos dematiáceos, bactérias e leveduras) presentes nas placas foram avaliados. Os ensaios foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições (placas). As médias dos tratamentos em cada ensaio foram comparadas pelo Teste-t ( $P < 0,05$ ).

Para a avaliação da sensibilidade do meio na detecção e quantificação de *C. perennans*, 160 frutos de macieiras “Fuji” foram aspergidos com álcool 70% e secos em temperatura ambiente para reduzir a contaminação pelo patógeno, visando à redução do erro experimental gerado pelo inóculo previamente depositado sobre a superfície das maçãs. Após a secagem, os frutos foram inoculados pela aspersão de suspensões de conídios de *C. perennans*, nas concentrações de  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ , ajustadas com hemacitômetro. As suspensões foram obtidas a partir de colônias desenvolvidas por 14 dias, a  $20^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 12h. Foram utilizados 40 frutos para cada concentração de inóculo e destes 20 frutos foram analisados para a detecção de propágulos pelo método de lavagem e cultivo de amostras das suspensões no meio semiseletivo selecionado e em BDA acidificado. No restante dos frutos, foi feita a detecção de infecções latentes conforme VALDEBENITO-SANHUEZA et al. (2006), sendo registrada a incidência da podridão “olho de boi” (%). O tratamento testemunha foi composto pelo mesmo número de frutos pulverizados com ADE. O ensaio foi conduzido em blocos ao acaso, com cinco repetições, compostas por uma amostra de quatro frutos. Os dados foram submetidos à análise de correlação linear entre a concentração da suspensão de conídios inoculada nos frutos e o número de conídios de *C. perennans* isolados nas placas após a lavagem, obtido pela fórmula  $N_{\text{conídios.fruto}}^{-1} = (N_{\text{colônias.placa}}^{-1} \times 0,1 \times 400)/4$ ; em que  $N_{\text{conídios.fruto}}^{-1}$ : número de conídios por frutos,  $N_{\text{colônias.placa}}^{-1}$ . A inoculação por aspersão buscou simular o que provavelmente ocorre em condições naturais de

infecção, em que os níveis de inóculo testados tinham por objetivo avaliar a capacidade de recuperação do patógeno, assumindo-se que o meio semiseletivo deveria ser capaz de detectar e apresentar correlação na recuperação com a concentração de inóculo aspergida. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico SAS (versão 9, SAS Institute, Cary, NC).

No ensaio para avaliação dos inibidores de contaminantes, não foi observado crescimento de *C. perennans* nos meios suplementados com nistatina na dose de  $25\mu\text{g mL}^{-1}$ . O desenvolvimento de *C. perennans* foi estatisticamente igual ( $P > 0,05$ ) ao observado no meio BDA acidificado e nos com meios com tetraciclina em pH neutro (Figura 1A e Figura 1B). Segundo MILLER (1932), *C. perennans* apresenta desenvolvimento em BDA, numa faixa de pH entre 2,2 e 11,3. Dessa forma, a ampla faixa de pH para o crescimento de *C. perennans* pode explicar a similaridade no crescimento micelial em BDA e BDA pH 4,5.

O menor tempo necessário para a realização das avaliações foi de sete dias, pelo uso dos meios BDA acidificado e BDA+tetraciclina. A diminuição das doses de nistatina permitiu o crescimento de *C. perennans* apenas na menor concentração ( $1\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Após sete dias de incubação, o meio BDA com pH neutro suplementado com tetraciclina, nistatina e iprodiona, nas respectivas doses de  $12,5\mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $1\mu\text{g mL}^{-1}$  e  $1\mu\text{g mL}^{-1}$ , não inibiu o desenvolvimento de *C. perennans* quando comparado ao meio BDA pH neutro ou em BDA acidificado ( $P > 0,05$ ) (Figura 1C e Figura 1D). Na validação do meio semiseletivo contendo os dois antibióticos e o fungicida, foi observada uma redução significativa do número de fungos leveduriformes, dematiáceos e de leveduras e, em relação ao meio BDA acidificado, não reduziu a recuperação de colônias de *C. perennans* dos frutos inoculados (Figura 1F) ou não inoculados (Figura 1E) ( $P > 0,05$ ). Conforme SPOTTS (1985), um meio semiseletivo deve ser capaz de recuperar o patógeno de interesse também sob condições de infestação natural para reduzir a probabilidade de falsos negativos, conforme apresentado pelo mesmo autor em isolamentos de patógenos em pêras, com a utilização de BDA acidificado. Apesar de o meio BDA pH 4,5 ter permitido recuperar o mesmo número de colônias de *C. perennans* que o meio semiseletivo proposto, esse último, em atividades de rotina no laboratório, apresenta como vantagem a facilidade nas avaliações pelo menor número total de contaminantes. Tal resultado corrobora as avaliações realizadas por MAFFIOLETI (2007), uma vez que a utilização do meio BDA pH 4,5 permitiu a recuperação de *C. perennans* em números semelhantes,



com a utilização do meio BDATNI. Finalmente, o meio semiseletivo permitiu detectar e quantificar o inóculo do patógeno presente na superfície dos frutos nas quatro concentrações de inóculo aspergidas sobre os frutos ( $r=0,88$ ;  $P=0,04$ ), o que não ocorreu pela utilização do BDA acidificado ( $r=0,23$ ;  $P=0,47$ ). A incidência da podridão “olho de boi” nos frutos incubados só foi observada nos tratamentos com aspersão de  $10^5$  e  $10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ , com incidência média de 4 e 8%, respectivamente.

O meio semiseletivo proposto no presente trabalho possibilitará estudos de flutuação de inóculo, uma vez que permite detectar com correção o inóculo nos frutos, principalmente, na fase final de formação do fruto, período de maior suscetibilidade às infecções por *C. perennans* (HENRÍQUEZ et al., 2008). A maior restrição no desenvolvimento dos microorganismos e a adequada quantificação de *C. perennans*, quando comparada à obtida pelo uso de BDA acidificado, em associação com a fácil preparação, qualificam a

utilização do meio semiseletivo em trabalhos de rotina do laboratório.

## REFERÊNCIAS

- AMIRI, A. et al. A new selective medium for the recovery and enumeration of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena*, and *M. laxa* from stone fruits. **Phytopathology**, v.99, n.10, p.1199-1208, 2009. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-99-10-1199>>. Acesso em: 15 out. 2009. doi:10.1094/PHYTO-99-10-1199
- BOGO, A. et al. Caracterização morfológica de isolados de *Cryptosporiopsis perennans* em diferentes meios de cultura. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.3, p.248-251, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/tpp/v33n3/a13v33n3.pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2009.
- GROVE, G.G. et al. Perennial canker of apple: seasonal host susceptibility, spore production, and perennation of *Cryptosporiopsis perennans* in infected fruit in Eastern Washington. **Plant Disease**, v.76, n.11, p.1109-1114, 1992. Disponível em: <[http://www.apsnet.org/pd/PDFS/1992/PlantDisease76n11\\_1109.PDF](http://www.apsnet.org/pd/PDFS/1992/PlantDisease76n11_1109.PDF)>. Acesso em: 16 dez. 2007.
- MAFFIOLETI, M.A. **Caracterização morfofisiológica e infecção de *Cryptosporiopsis perennans* em maçã**. 2007. 65f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade do Estado de Santa Catarina.
- MILLER, E.V. Some physiological studies of *Gloeosporium perennans* and *Neofabraea malicorticis*. **Journal of Agricultural Research**, v.45, p.65-77, 1932.
- PHILLIPS, D.J.; HARVEY, J.M. Selective medium for detection of inoculum of *Monilinia* spp. on stone fruits. **Phytopathology**, v.65, p.1233-1236, 1975.
- HENRÍQUEZ, J.L. et al. Effects of environmental factors and cultural practices on bull's eye rot of pear. **Plant Disease**, v.92, n.3, p.421-424, 2008. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS-92-3-0421>>. Acesso em: 12 abr. 2008. doi: 10.1094/PDIS-92-3-0421.
- SPOTTS, R.A. Environmental factors affecting conidial survival of five pear decay fungi. **Plant Disease**, v.69, p.391-392, 1985. Disponível em: <[http://www.apsnet.org/pd/PDFS/1985/PlantDisease69n05\\_388.PDF](http://www.apsnet.org/pd/PDFS/1985/PlantDisease69n05_388.PDF)>. Acesso em 20 set. 2008.
- VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. Ocorrência de *Cryptosporiopsis perennans* em macieiras 'Fuji' no sul do Brasil. **Summa Phytopathologica**, v.28, n.2, p.204-206, 2002.
- VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. et al. **Características e controle da podridão 'olho-de-boi' nas maçãs do Sul do Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2006. 13p. (Circular Técnica, 66).