

## **Caracterização morfológica e patogênica dos isolados E-72-01 e E-72-05 de *Pestalotiopsis* sp. provenientes de folhas de *Eucalyptus grandis***

**Marina Gabriela Marques<sup>1\*</sup>(IC), Luana Martins Pires<sup>2</sup>(IC), Deziany da Silva Ferreira<sup>2</sup>(IC), Lincon Rafael da Silva<sup>3</sup>(PG), Daniel Diego Costa Carvalho<sup>4</sup>(PQ)**

<sup>1</sup>Acadêmica e bolsista PIBIC/CNPq do curso de Agronomia, Universidade Estadual de Goiás, Ipameri.

<sup>2</sup>Acadêmica do curso de Agronomia, Universidade Estadual de Goiás, Ipameri. <sup>3</sup>Pós-graduando em Produção Vegetal, Universidade Estadual de Goiás, Ipameri. <sup>4</sup>Professor Doutor, Universidade Estadual de Goiás, Ipameri. \*magabimarkes@hotmail.com

**Resumo:** Entre as doenças fúngicas encontradas no eucalipto, destaca-se a mancha foliar causado pelo patógeno *Pestalotiopsis* sp. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização morfológica e patogênica de dois isolados de *Pestalotiopsis* sp. obtidos a partir de lesões em folhas de eucalipto. Para isso, foram utilizadas para confecção de lâminas microscópicas semi-permanentes, discos de micélios dos isolados E-72-01 e E-72-05, em seguida, a caracterização morfológica foi baseada em características dos conídios. Já para a patogenicidade, foram utilizadas folhas saudáveis de Eucalipto, e inoculados os mesmos isolados de *Pestalotiopsis* sp. submetidas a condições controladas de câmara úmida. As avaliações da severidade da doença foram realizadas aos 2, 4, 6, 8 e 10 dias após a inoculação (DAI), aplicando-se uma escala de notas. Para as análises estatísticas, foi considerado o ponto médio de cada nota atribuída. Após caracterização morfológica, verificou-se que os isolados E-72-01 e E-72-05 tratam-se de *P. microspora*. O potencial patogênico não variou entre os isolados, possibilitando a reprodução dos sintomas característicos da doença.

Palavras-chave: Patologia florestal. Micologia. Epidemiologia.

### **Introdução**

O eucalipto (*Eucalyptus* spp), é uma cultura de grande importância econômica, e é cultivado para os mais diversos fins, tais como, papel, celulose, lenha, carvão, entre outros (SANTOS, 2001). As condições favoráveis de clima, solo e a grande oferta de áreas para o plantio fazem do Brasil um dos mais promissores mercados mundiais desta espécie (BIZI, 2005). O eucalipto é atacado por vários patógenos, principalmente fungos, desde a fase de viveiro até os plantios adultos e, geralmente, os problemas são observados nas plantações, ocorrendo nos mais variados locais, espécies e épocas do ano (ALFENAS et al., 2009).

Entre as doenças fúngicas encontradas no eucalipto, destaca-se a mancha foliar causado pelo patógeno *Pestalotiopsis* sp. O gênero *Pestalotiopsis* encontra-se amplamente distribuído, ocorrendo em solos, ramos, sementes, frutos e folhas podendo ser parasita, endofítico ou saprófita (JEEWON et al., 2004).

A classificação do gênero *Pestalotiopsis*, segundo muitos taxonomistas, baseou-se durante muitos anos, em características que incluem tamanho, septação, pigmentação do conídio e ausência ou presença de apêndices (NAG RAG, 1993; SUTTON, 1980), porém JEEWON et al. (2004), sugere que a classificação taxonômica considere os seguintes critérios: pigmentação de células medianas; morfologia dos apêndices apicais, comprimento dos apêndices apicais e comprimento do esporo.

Além disso, especial atenção tem sido dada ao fungo *Pestalotiopsis* sp., sobretudo ao fato de recentemente ter sido relatado como responsável por lesões na casca de plantas de *Eucalyptus globulus* (ALONSO et al., 2009) e também como um fungo endofítico e epifítico em folhas de *Eucalyptus citriodora* (KHARWAR et al., 2010). Neste contexto, conhecer o potencial infectivo e a virulência de isolados de patógenos, tal como *Pestalotiopsis*, é importante quando se pensa na adoção de medidas de manejo integrado e no aumento da produtividade (LIMA et al., 2004).

A solicitação contínua de informações e realização de pesquisas sobre a identificação de patógenos e sua virulência, visa auxiliar o melhor conhecimento dos problemas bióticos inerentes ao eucalipto e no estabelecimento de estratégias adequadas de controle e contribuir para a redução de perdas e aumentar a produtividade no setor florestal (SANTOS et al., 2001; KHARWAR et al., 2010). Em decorrência, é fundamental o estudo morfológico destes fungos para correta identificação e direcionamento de medidas de controle (SANTOS, 2001), bem como a caracterização patogênica de *Pestalotiopsis* sp. de eucalipto no Brasil. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização morfológica e patogênica de isolados de *Pestalotiopsis* sp. obtidos a partir de lesões em folhas de eucalipto.

## Material e Métodos

### **Caracterização morfológica dos isolados obtidos**

Placas de Petri, contendo micélios dos isolados E-72-01 e E-72-05 (sete dias de idade), provenientes de folhas de eucalipto, foram utilizadas para confecção de lâminas microscópicas semi-permanentes, foram confeccionadas a partir de culturas dos isolados E-72-01 e E-72-05, previamente cultivados em meio BDA. Em seguida, a caracterização morfológica foi baseada nas seguintes características: (1) comprimento e largura dos conídios; (2) comprimento e largura da célula mediana dos conídios, (3) cor da célula mediana dos conídios; (4) número e comprimento dos apêndices apicais e basal, (5) posicionamento de inserção dos apêndices apicais e (6) ornamentação/ramificação dos apêndices apicais. As medições das estruturas fúngicas de cada isolado foram realizadas com auxílio do programa LAS EZ, obtendo-se a média de 30 medições para cada estrutura. As lâminas obtidas foram depositadas no Laminário Fitoapológico da UEG.

### **Avaliação do potencial patogênico dos isolados de *Pestalotiopsis* sp. utilizando disco de micélio**

Folhas saudáveis de plantas adultas de *Eucalyptus grandis* cv. 'GG 100' (18 a 24 meses de idade) foram lavadas em água corrente e deixadas para secagem em câmara de fluxo laminar por 10 min (CARVALHO et al., 2008). Para as inoculações, foram realizados cinco furos no centro do limbo foliar com auxílio de uma agulha e depositado um disco de ágar (7 mm) contendo micélio do fungo *Pestalotiopsis* sp. (isolados E-71-01 e E-71-05) com 5 dias de repicagem. As folhas inoculadas com o patógeno foram submetidas a condições controladas de câmara úmida em caixas acrílicas transparentes (gerbox – 11 x 11 cm), contendo uma folha de papel de germinação com manutenção de umidade constante apenas no papel. Em seguida, foram realizadas medições das lesões na face abaxial das folhas aos 4, 6, 8 e 10 dias após a inoculação (DAI), com o auxílio de um paquímetro digital, obtendo-se o tamanho das lesões em mm<sup>2</sup>.

### **Análises estatísticas**

Os resultados relativos a caracterização micromorfológica, foram submetidos à análise de variância. Na avaliação do potencial patogênico, os dados referentes às lesões causadas por *Pestalotiopsis* foram submetidos ao teste de Tukey e à análise de regressão para obtenção de modelos significativos. A severidade foi integralizada como área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) através da fórmula  $AACPD = \sum [(y1 + y2)/2] \cdot (t2 - t1)$ , onde  $y1$  e  $y2$  são duas avaliações consecutivas realizadas nos tempos  $t1$  e  $t2$ , respectivamente. Em todas as análises foi empregado o programa estatístico Sisvar 5.3 (FERREIRA, 2011).

## Resultados e Discussão

Os isolados E-72-01 e E-72-05 apresentaram conídios com cinco células, sendo hialinas as células apicais e basais, e as três células medianas de coloração marrom claro a marrom escuro. Medições dos conídios não revelaram diferença entre os isolados de *Pestalotiopsis*. Após a mensuração dos conídios dos isolados E-72-01 e E-72-05, verificou-se que estes possuíam dimensões de  $23,2 \pm 2,8$  a  $27,3 \pm 1,7$   $\mu\text{m}$  de comprimento médio respectivamente e  $5,2 \pm 0,5$  a  $5,9 \pm 0,5$   $\mu\text{m}$  de largura média. A relação comprimento/largura (C/L) dos conídios variou de  $4,5 \pm 0,7$  a  $4,6 \pm 0,5$   $\mu\text{m}$ . As células medianas dos conídios apresentaram  $4,7 \pm 0,9$  a  $6,4 \pm 0,5$   $\mu\text{m}$  de comprimento médio e  $5,2 \pm 0,5$  a  $5,9 \pm 0,5$   $\mu\text{m}$  de largura média. Os apêndices apicais eram hialinos, a um número de 2 a 3 por conídio, e com comprimento médio variando de  $11,6 \pm 3,7$  a  $12,9 \pm 3$   $\mu\text{m}$ . Não foram observadas protuberâncias e nem ramificações nos apêndices apicais e estes, possuíam inserção no topo da célula apical hialina. Foi constatado a presença de 1 apêndice basal hialino nos conídios e com comprimento médio variando de  $5,8 \pm 1,5$  a  $5,4 \pm 1,5$   $\mu\text{m}$ .

**Tabela 1.** Características dos conídios de *Pestalotiopsis microspora* obtidos de plantas adultas de *Eucalyptus grandis* 'GG 100'. Ipameri, Goiás, Brasil, 2016.

Isolados	Conídios <sup>(1)</sup>			Célula Mediana <sup>(1)</sup>		Apêndices <sup>(1)</sup>			
	Comp ( $\mu\text{m}$ )	Largura ( $\mu\text{m}$ )	C/L <sup>(2)</sup>	Comp ( $\mu\text{m}$ )	Largura ( $\mu\text{m}$ )	Apical		Basal	
						N	Comp ( $\mu\text{m}$ )	N	Comp ( $\mu\text{m}$ )
E-72-01	$23,2 \pm 2,8$	$5,2 \pm 0,5$	$4,5 \pm 0,7$	$4,7 \pm 0,9$	$5,2 \pm 0,5$	2-3	$11,6 \pm 3,7$	1	$5,8 \pm 1,5$
E-72-05	$27,3 \pm 1,7$	$5,9 \pm 0,5$	$4,6 \pm 0,5$	$6,4 \pm 0,5$	$5,9 \pm 0,5$	2-3	$12,9 \pm 3$	1	$5,4 \pm 1,5$

<sup>(1)</sup>Médias referentes a 30 conídios por isolado  $\pm$  desvio padrão.

<sup>(2)</sup>C/L: relação comprimento/largura do conídio.

Não houve diferença estatística entre os isolados quanto a área foliar lesionada (AFL), conforme Tabela 2. Após análises de regressão para o aumento das lesões nas folhas ao longo do tempo, o isolado E-72-05 foi ajustado por um modelo linear, já o isolado E-72-01 se ajustou a um modelo polinomial de segundo grau. Todos os modelos foram significativos, entretanto com grande variação do coeficiente de determinação ( $r^2$ ). Também não houve diferença estatística entre os isolados quanto a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) com média de 156,65. Os coeficientes de variação foram baixos, com valor de 16,07%, para AFL e, de 16,26% para AACPD.

**Tabela 2.** Área foliar de *Eucalyptus grandis* “GG100”, lesionada (AFL) por *Pestalotiopsis microspora* aos 10 dias após inoculação (DAI), modelos de regressão para aumento das lesões nas folhas e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) dos 4 aos 10 DAI.

Isolado	AFL aos 10 DAI (mm <sup>2</sup> ) <sup>(1)</sup>	Modelo de regressão	r <sup>2</sup> (%)	(P≤X)	AACPD <sup>(1)</sup>
E-72-01	30,8 a	Y = -1,8541x <sup>2</sup> + 30,6416x - 91,5333	94,63%	0,01	150,8 a
E-72-05	29,7 a	Y = 0,7000x + 22,4333	90,00%	0,01	162,5 a
CV	16,09 %	-	-	-	16,26 %

<sup>(1)</sup>Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente, segundo o teste de Tukey (P≤0,05).

O gênero *Pestalotiopsis* é complexo e pode ser difícil de classificar ao nível de espécie, porque características como estrutura de frutificação, comprimento e morfologia dos conídios, tendem a variar dentro das espécies e também com qualquer mudança no ambiente (KARAKAYA, 2001). WEI et al. (2007) destacaram que apesar de eventuais divergências, o fungo *Pestalotiopsis* sp., tem geralmente alguma característica morfológica e fisiológica específica, tais como: forma do conídio e formação dentro acérvulo compacto; conídios com geralmente cinco células, sendo três células medianas coloridas, e duas células finais incolores; e conídios com dois apêndices apicais decorrentes da célula apical. Tais caracteres tem auxiliado na distinção, portanto, de espécies de *Pestalotiopsis* (Kruschewsky,

2010). As características apresentadas na Tabela 1, corroboram com descrições reportadas por Keith et al. (2006), Wu et al. (2009), Kruschewsky (2010), Zhang et al. (2010), Maharachchikumbura et al. (2011), Chen et al. (2012) e Jeon e Cheon, (2014), sugerindo os isolados E-72-01 e E-72-05 tratar-se de *P. microspora*.

MACIEL et al. (2012), verificaram a patogenicidade de *Pestalotiopsis* causando lesões necróticas em folhas de aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius*) e com posterior coalescimento e queda das folhas. De forma análoga ao presente estudo, WU et al. (2009) também reportaram *P. microspora* em *Reineckea carnea*, uma planta herbácea medicinal, causando lesões de coloração marrom escuro, ovais e com 20-50 mm<sup>2</sup> no limbo foliar, devido ao coalescimento destas. O fato de não existir diferença entre os isolados de *P. microspora* do presente estudo (E-72-01 e E-72-05) quanto ao tamanho da área foliar lesionada e AACPD, pode estar relacionado com a natureza de obtenção destes, ou seja, o fato de pertencerem a uma mesma população e, portanto, descendentes de um ancestral comum (JEEWON et al., 2002).

## Considerações Finais

- 1 - Conclui-se, baseado nas informações micromorfológicas que os isolados E-72-01 e E-72-05, provenientes de folhas de eucalipto tratam-se de *P. microspora*.
- 2 - O potencial patogênico não variou entre os isolados de *Pestalotiopsis* sp. em que foram obtidos modelos significativos e com alto coeficiente de determinação ( $r^2$ ) para o progresso da doença. A metodologia de inoculação avaliada proporcionou reprodução dos sintomas da doença.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por uma bolsa de iniciação científica e e ao Programa de Bolsa de Incentivo à Pesquisa e Produção Científica (PROBIP) da Universidade Estadual de Goiás (UEG) por uma bolsa de produtividade em pesquisa.

## Referências

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 2009. 500p.

ALONSO, R.; TISCORNIA, S.; ALFENAS, A.C.; BETTUCCI, L. Fungi associated to bark lesions of *Eucalyptus globulus* stems in plantations from Uruguay. **Revista Árvore**, v.33, n.4, p.591-597, 2009.

BIZI, R. M.; GRIGOLETTI JUNIOR, A.; AUER, C. G. Seleção de fungicidas para o controle de oídio em Eucalipto. **Pesquisa Florestal**, v. 51, p.100-107. 2005.

CARVALHO, D.D.C.; ALVES, E.; BATISTA, T.R.S.; CAMARGOS, R.B.; LOPES, E.A.G.L. Comparison of methodologies for conidia production by *Alternaria alternata* from citrus. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.792-798, 2008.

CHEN, F.Y.; LU, L.M.; NI, H.Z.; WANG, Y.; WANG, Y.G.; LI, G.Q. First Report of *Pestalotiopsis mangiferae* and *P. vismiae* Causing Twig Dieback of *Myrica rubra* in China. **Plant Disease**, v.96, n.4, p.588.3-588.3, 2012.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, p.1039-1042, 2011.

JEEWON, R; LIEW, E.C.Y.; HYDE, K.D. Phylogenetic evaluation of species nomenclature of *Pestalotiopsis* in relation to host association. **Fungal Diversity**, n.17, p.39-55, 2004.

JEEWON, R.; LIEW, E.C.Y.; HYDE, K.D. Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and allied genera Inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.25, n.3, p.378-392, 2002.

JEON, Y.H.; CHEON, W. First Report of Leaf Blight of Japanese Yew Caused by *Pestalotiopsis microspora* in Korea. **Plant Disease**, v.98, n.5, p.691.1-691.1, 2014.

KARAKAYA, A. First report of Infection of kiwifruit by *Pestalotiopsis* sp. In Turkey. **Plant Disease**, v.85, p.1028. 2001.

KEITH, L. M.; VELASQUEZ, M. E.; ZEE, F. T. Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing scab disease of guava, *Psidium guajava*, in Hawaii. **Plant Disease**, v.90, p.16-23, 2006.

KHARWAR, R.N.; GOND, S.K.; KUMAR, A.; MISHRA, A. A comparative study of endophytic and epiphytic fungal association with leaf of *Eucalyptus citriodora* Hook, and their antimicrobial activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.26, p.1941-1948, 2010.

KRUSCHEWSKY, M.C. **Taxonomia e ecologia do gênero *Pestalotiopsis* no Brasil, com ênfase para a mata atlântica do sul da Bahia**. Dissertação de mestrado em Produção Vegetal. Itabuna: Universidade Estadual de Santa Cruz. 2010, 68p.

LIMA, C.S.; SOUZA, P.E.; BOTELHO, A.O. Fungos da família Pucciniaceae causadores de ferrugem em plantas medicinais. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.499-503, 2004.

MACIEL, C.G.; FERRERA, T.S.; BOVOLINI, M.P.; GONZATTO, R.; MUNIZ, M.F.B.; BURIOL, G.A. Transmissão de fungos via semente e patogenicidade de *Pestalotiopsis* sp. em mudas de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Semina Ciências Agrárias**, v.33, n.1, p.2767-2774, 2012.

MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.N.; GUO, L.D.; CHUKEATIROTE, E.; BAHKALI, A.H.; HYDE, K.D. *Pestalotiopsis* - morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. **Fungal Diversity**, v.50, p.167-187, 2011.

NAG RAG, T. R. **Coelomycetous Anamorphs with Appendage-Bearing Conidia**. Mycologue Publications, 1993, 1101p.

SANTOS, A.F.; AUER, C.G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. **Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle.** Colombo: Embrapa Florestas. Circular Técnica, 45. 2001. 20p.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervular and Stromata.** Kew, Surrey: Commonwealth Mycological Institute, 1980, 606p.

WEI, J.-G.; XU, T.; GUO, L.-D.; LIU, A.R.; ZHANG, Y.; PAN, X.H. Endophytic *Pestalotiopsis* species associated with plants of Podocarpaceae, Theaceae and Taxaceae in Southern China. **Fungal Diversity**, v.24, p.55-74, 2007.

WU, M.D.; LI, G.Q.; JIANG, D.H. First Report of *Pestalotiopsis microspora* Causing Leaf Blight of *Reineckea carnea* in Central China. **Plant Disease**, v.93, n.6, p.667.1-667.1, 2009.

ZHANG, M.; WU, H.Y.; TSUKIBOSHI, T.; OKABE, I. First Report of *Pestalotiopsis microspora* Causing Leaf Spot of Hidcote (*Hypericum patulum*) in Japan. **Plant Disease**, v.94, n.8, p.1064, 2010.