

Uso de miniestacas destacadas de espécies florestais para testes de patogenicidade

Izabela Moura Duin¹, Thiare Aparecida do Valle Coelho², Celso Garcia Auer³, Álvaro Figueredo dos Santos⁴

¹Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Agronomia, CEP: 86057-970, Londrina, PR, Brasil. ²Universidade Federal do Paraná, Departamento de Engenharia Florestal, 80210-170, Curitiba, PR, Brasil. ³Embrapa Florestas, CP 319, 83411-000, Colombo, PR, Brasil. ⁴Universidade Federal do Paraná, Departamento de Produção Vegetal, 80035-050, Curitiba, PR, Brasil.

Autor para correspondência: Celso Garcia Auer (celso.auer@embrapa.br)

Data de chegada: 11/04/2019. Aceito para publicação em: 11/04/2022

10.1590/0100-5405/222600

RESUMO

Duin, I.M.; Coelho, T.A.V.; Auer, C.G.; Dos Santos, A.F. Uso de miniestacas destacadas de espécies florestais para testes de patogenicidade. *Summa Phytopathologica*, v.48, n.3, p.136-138, 2022.

A podridão e morte de miniestacas tem sido verificada na produção de mudas clonais de acácia-negra, eucalipto, erva-mate e pinus. Porém, vários fungos rotineiramente são encontrados em associação com a doença, dificultando sua etiologia. Assim, uma metodologia foi desenvolvida para

se fazer o teste de patogenicidade com fungos isolados de miniestacas com podridão. A metodologia foi considerada eficiente, rápida e de fácil aplicação para determinar a patogenicidade de fungos em miniestacas destacadas.

Palavras-chave: acácia-negra, eucalipto, erva-mate, pinus. propagação vegetativa

ABSTRACT

Duin, I.M.; Coelho, T.A.V.; Auer, C.G.; Dos Santos, A.F. Use of detached minicuttings of forest species for pathogenicity tests. *Summa Phytopathologica*, v.48, n.3, p.136-138, 2022.

Rot and death of minicuttings have been verified in the production of clonal seedlings of black wattle, eucalypt, yerba mate and pine. However, several fungi are routinely found in association with the disease, making its etiology difficult. Thus, a methodology was

developed to conduct the pathogenicity test with fungi isolated from minicuttings with rot. The methodology was considered efficient, rapid and easy to apply for determining the pathogenicity of fungi in detached minicuttings.

Keywords: black wattle, eucalypt, yerba mate, pine, vegetative propagation.

Ao isolarmos fungos fitopatogênicos obtêm-se a cultura pura através do tecido doente do hospedeiro, água, substrato ou solo. É necessário obter o patógeno em cultura pura para estudos de morfologia, taxonomia, reprodução, fisiologia, e para utilização em testes de patogenicidade. Obter o organismo em cultura pura a partir de uma planta doente, não significa que ele seja o agente causal. Para isso é necessário realizar o teste de patogenicidade seguindo as regras do postulado de Koch, que consiste na: associação do organismo suspeito com os sintomas da doença; isolamento do organismo em cultura pura; inoculação do organismo isolado em plantas sadias e reprodução dos sintomas da doença; reisolamento do mesmo organismo isolado (1).

Para a realização do teste de patogenicidade em miniestacas, procurou-se uma metodologia eficiente e de fácil execução. O método desenvolvido nesse estudo foi baseado na afirmação de Alfenas e Ferreira (2), os quais mencionaram que é possível realizar teste de patogenicidade com qualquer parte de uma planta e de Vitti et al. (3), que fizeram testes de patogenicidade com fungos em estacas de *Eucalyptus* spp., porém, nenhum desses autores detalharam essa metodologia. Deste modo, o objetivo desse trabalho foi apresentar uma metodologia detalhada para testes de patogenicidade com miniestacas destacadas.

Os fungos empregados neste estudo (Tabela 1) foram obtidos a partir de miniestacas de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.),

eucalipto (*Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage), erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.-Hil.), e pinus (*Pinus elliottii* var *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*), com podridão coletadas em viveiro empresarial, comercial e da Embrapa Florestas nas cidades de Triunfo/RS, Guarapuava/PR, e Colombo/PR, respectivamente.

Esses isolados foram obtidos por isolamentos direto e indireto, purificados e mantidos em placas com meio BDA (extrato comercial de batata, dextrose e ágar, 39 g; água ultrapurificada, 1.000 mL) no Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas, Colombo, PR.

A metodologia consistiu na inoculação dos fungos na base de miniestacas sadias das espécies florestais hospedeiras. O inóculo consistiu de discos de 7 mm de diâmetro de micélio-ágar com o fungo crescido em meio BDA por 7 dias, e incubados em câmara B.O.D. a 24 ± 2 °C, no escuro. Na preparação das miniestacas, estas foram desinfestadas superficialmente com solução de álcool 70 % por 30 s e solução de hipoclorito de sódio 1 % por 1 min.

Como tratamento testemunha, as miniestacas foram inoculadas com discos de meio BDA sem fungo. As miniestacas inoculadas foram incubadas em caixas gerbox com papel mata-borrão estéril umedecido, mantidos sob luz fluorescente contínua, em condições de ambiente, por 7 dias, quando se realizou a avaliação e o reisolamento.

As caixas gerbox utilizadas foram desinfestadas com solução

Tabela 1: Fungos isolados de miniestacas com podridão de acácia-negra, eucalipto, erva-mate e pinus utilizados nesse estudo.

Patógeno	Hospedeiro	Local de coleta
<i>Calonectria polizzii</i> L. Lombard, Crous & M.J. Wingf.	Acácia-negra	Triunfo/RS
<i>Fusarium oxysporum</i> Schltldl	Acácia-negra	Triunfo/RS
<i>Neopestalotiopsis clavispora</i> (G.F. Atk.) Maharachch., K.D. Hyde & Crous	Acácia-negra	Triunfo/RS
<i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn	Acácia-negra	Triunfo/RS
<i>Botrytis</i> sp.	Eucalipto	Guarapuava/PR
<i>Cylindrocladium</i> sp.	Eucalipto	Guarapuava/PR
<i>Fusarium</i> sp.	Eucalipto	Guarapuava/PR
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Eucalipto	Guarapuava/PR
<i>Cylindrocladium</i> sp.	Erva-mate	Colombo/PR
<i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn	Pinus	Colombo/PR

de hipoclorito de sódio a 1% e o papel mata-borrão utilizado foi esterilizado em autoclave a 120 °C, 1,5 atm, por 20 min. Foi utilizada água ultrapurificada estéril (esterilizada nas mesmas condições do papel mata-borrão) para umedecer o papel mata-borrão e formar a câmara úmida. Em cada caixa gerbox foram dispostas 5 miniestacas inoculadas, sem contato entre as mesmas. As miniestacas apresentavam cerca de 10 cm de comprimento. Para melhor alocação das miniestacas de eucalipto, o tamanho de suas folhas foi reduzido em aproximadamente 50%.

Na avaliação, após o período de incubação, verificou-se a presença de sintomas e mediu-se o comprimento da lesão, com o auxílio de paquímetro digital. O reisolamento consistiu no isolamento indireto dos fragmentos de cada miniestaca em meio BDA e incubação em câmara B.O.D. a 24 ± 2 °C, no escuro. Os fungos reisolados foram comparados com as culturas originais.

As miniestacas inoculadas exibiram os mesmos sintomas constatados nos viveiros, apresentando lesões escuras e podridão da base e as testemunhas não tinham sintomas de podridão de miniestacas. Vitti et al. (3), observaram podridão em estacas de *Eucalyptus* spp. com inoculação de *Cylindrocladium* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Rhizoctonia* sp., *Dothiorella* sp. e *Pythium* sp.

Nas miniestacas de acácia-negra inoculadas com *C. polizzii* e *N. clavispora*, as lesões progrediram em 100% das miniestacas inoculadas, enquanto nas inoculadas com *F. oxysporum* e *R. solani*, ocorreu crescimento epifítico e as lesões ocorreram somente na base da miniestaca (Figura 1a). Nas miniestacas de eucalipto (Figura 1b), erva-mate (Figura 1c) e pinus (Figura 1d), todos os fungos inoculados apresentaram lesões que progrediram sobre as mesmas em 100% das

miniestacas inoculadas. Para o eucalipto, *Botrytis* sp., mostrou-se mais agressivo que os demais fungos testados, e para a erva-mate, em todas as miniestacas, as lesões causadas por *Cylindrocladium* sp. progrediram em mais de 50% do comprimento da miniestaca.

Em miniestacas de acácia-negra, *Fusarium* spp. e *R. solani* não foram considerados patogênicos e *C. polizzii* e *N. clavispora* foram considerados os agentes causais da podridão de miniestacas. Para o eucalipto, *Botrytis* sp., *Cylindrocladium* sp., *Fusarium* sp. e *Pestalotiopsis* sp. foram considerados os agentes causais da podridão de miniestacas. Para erva-mate e pinus, *Cylindrocladium* sp., e *R. solani*, respectivamente, foram considerados patogênicos e agentes causais da podridão de miniestacas.

Desta forma, o teste foi considerado efetivo para determinar a patogenicidade de fungos em miniestacas destacadas. O teste foi considerado viável e de rápida execução.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à CAPES pela bolsa dos dois primeiros autores e a Embrapa Florestas pelo apoio estrutural e técnico.

REFERÊNCIAS

1. Agrios, G.N. **Plant Pathology**. 5 ed. Academic Press, San Diego. 2005. 922p.
2. Alfenas, A.C.; Ferreira, F.A. Inoculação de fungos fitopatogênicos. In: Alfenas A.C.; Mafía, R.G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: Editora UFV, 2007. p. 117-138.
3. Vitti, A.N.; Krügner, T.L.; Vieira, J.D. Etiologia da podridão de estacas de *Eucalyptus* spp. em casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, n.2, p. 126, 1989 (Resumo 083).



Figura 1: Patogenicidade de fungos fitopatogênicos em miniestacas destacadas. A: Miniestacas de acácia-negra. B: Miniestacas de eucalipto. C: Miniestacas de erva mate. D: Miniestacas de pinus.