

## CRESCIMENTO DE ISOLADOS DE *Cylindrocladium spathulatum* DA ERVA-MATE, DE CINCO REGIÕES DO ESTADO DO PARANÁ\*

Albino Grigoletti Júnior\*\*  
Douglas Lau\*\*\*

### RESUMO

Em viveiros de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St Hil.), a pinta preta, causada por *Cylindrocladium spathulatum* é a principal doença fúngica na região sul do Brasil. Poucas são as informações epidemiológicas disponíveis neste patossistema. A fim de avançar nesta área, foi realizado o presente trabalho. Culturas monospóricas de *C. spathulatum*, obtidas de plantas colhidas em cinco regiões ervateiras: Cascavel, Colombo, Guarapuava, Ivaí e São Mateus do Sul, PR, foram testadas em diferentes meios de cultura. Os isolados foram cultivados nos meios: batata-dextrose-ágar, folha de erva-mate-dextrose-ágar, chimarrão dextrose-ágar, farinha de aveia-dextrose-ágar e malte-ágar, todos com pH entre 5,0 e 5,5. Em placas de Petri, de 9 cm de diâmetro, contendo cerca de 20 ml de cada meio de cultura foram colocados discos de ágar de 5 mm de diâmetro. As culturas foram mantidas em condições de luz e temperatura ambientes (18-30°C). Leituras do crescimento foram feitas aos 7 e 12 dias de incubação, pela medição do diâmetro da colônia em dois sentidos perpendiculares. Os isolados desenvolveram-se melhor nos meios de aveia e de folha de erva-mate, sendo observada boa taxa de esporulação. O meio produzido a partir de infuso de erva-mate processada e embalada (chimarrão) resultou em menor crescimento do fungo. As colônias produzidas apresentaram aspecto irregular e com baixa esporulação. O comportamento dos isolados estudados foi similar quanto ao crescimento, excetuando-se o de São Mateus do Sul, que apresentou uma taxa de crescimento maior em todos os meios testados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fungo, epidemiologia, doença de viveiro, pinta-preta

## GROWTH OF *Cylindrocladium spathulatum* ISOLATES FROM MATE LEAVES FROM FIVE REGIONS IN THE STATE OF PARANÁ

### ABSTRACT

Black spot on mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) leaves, caused by *Cylindrocladium spathulatum*, is the main nursery disease in southern Brazil. Because only few epidemiologic information are available on this pathosystem, this

---

\* Parte da monografia apresentada pelo segundo autor para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

\*\* Eng.-Agrônomo, Doutor, CREA n° 2711/D, Pesquisador da *Embrapa Florestas*.

\*\*\* Estagiário do Laboratório de Fitopatologia da *Embrapa Florestas*. Estudante do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

work was carried out in order to increase knowledge on this disease. Monosporic isolates of *C. spathulatum* from five regions within the distribution area of mate (Cascavel, Colombo, Guarapuava, Ivaí and São Mateus do Sul, all in the State of Paraná, Brasil) were tested for growth. Different culture media (potato-dextrose-agar, mate leaf-dextrose-agar, "chimarrão" dextrose agar, oat-meal dextrose agar and malt-agar medium), all with pH between 5 and 5.5 were tested. Nine centimeter Petri dishes containing 20ml of each medium were inoculated with 5 mm diameter agar disks. Cultures were maintained at room conditions (18-30°C). Assessments of growth were made at 7 and 12 days after inoculation by measuring two perpendicular diameters of each colony. The best culture media for growth and sporulation of *C. spathulatum* were oat-meal dextrose-agar and mate leaf-dextrose-agar. The medium made of "chimarrão" promoted the least growth of the fungus. Moreover, the aspect of the colony grown in this medium was irregular and had very low sporulation. The growth of all isolates was similar, except the one from São Mateus do Sul which showed high growth rate in all media.

**KEY WORDS:** Fungus, epidemiology, nursery disease.

## 1. INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) ocupa um importante papel sócio-econômico e cultural nos Estados da região Sul do Brasil, principalmente nas pequenas propriedades. Seu cultivo tem se expandido nos últimos anos, apresentando, no período de 1970 a 1992, um acréscimo de cerca de 84% na produção (Rodigheri et al., 1996). O aumento da área plantada e, conseqüentemente, uma maior demanda na produção de mudas, associada, muitas vezes, à baixa tecnologia utilizada, tem favorecido a ocorrência de doenças fúngicas nos viveiros de erva-mate. A pinta-preta, causada pelo fungo *Cylindrocladium spathulatum* El-Gholl, Kimbrough, Bernard, Alferi & Shoulties é considerada um dos principais problemas nos viveiros de erva-mate (Grigoletti & Auer, 1996).

O conhecimento das características da população de patógenos é essencial para programas de melhoramento de cultivares (Rowe & Beute, 1975). Estes autores verificaram que a variabilidade na população patogênica é um importante indicativo de como estes organismos podem se comportar quando da alteração da pressão de seleção para identificação de variedades resistentes. Estes estudos são importantes, principalmente quando se visa o controle destes patógenos. Tendo em vista a deficiência de informações disponíveis sobre esta doença da erva-mate, desenvolveu-se este estudo com o objetivo de avaliar o comportamento de isolados provenientes de cinco municípios do Estado do Paraná e de definir os meios de cultivo mais apropriados.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Obtenção dos isolados

Os isolados de *C. spathulatum* foram coletados de folhas provenientes de mudas coletadas em viveiros públicos e particulares nos municípios de Cascavel, Colombo, Guarapuava, Ivaí, e São Mateus do Sul, todos no Estado do Paraná (Tabela 1). Folhas com sintomas de pinta-preta foram colocadas em gerbox atêque

se tornassem evidentes as estruturas reprodutivas do fungo. Estas foram, sob microscópio estereoscópico, retiradas com estiletes e repicadas para placas contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar). O método indireto de isolamento foi realizado através do tratamento de fragmentos de tecido lesionado, em álcool 70%, por 10 segundos e, em seguida, em hipoclorito de sódio comercial a 0,2% de cloro ativo, por três minutos, seguido de transferência para placas contendo BDA.

Após o isolamento do patógeno em culturas puras, do material proveniente de cada município, foram obtidas as culturas monospóricas (Tabela 1).

Foi utilizada apenas uma cultura monospórica de cada um dos cinco municípios, para representar o isolado do respectivo município.

**TABELA 1. Origem das colônias monospóricas de *Cylindrocladium spathulatum* em folhas de erva-mate.**

Isolado (SIGLA)	Localidade - Viveiro	Colônias
		Monospóricas Obtidas
Colombo*	Colombo -PR	10
SMP*	São Mateus-PR - Prefeitura	7
GPI	Guarapuava-PR - IAP	7
GPP*	Guarapuava-PR - Prefeitura	12
IVAI*	Ivaí-PR - Bitumirim	15
Nobre*	Cascavel-PR - Mate-Nobre	10
IAP	Cascavel-PR - IAP	11
Ferroeste	Cascavel-PR - Ferroeste	1
<b>Total</b>		<b>73</b>

\* Isolados escolhidos para o desenvolvimento do trabalho.

## 2.2. Colônias monospóricas e conservação dos isolados

Conidióforos e conídios retirados de colônias puras ou de folhas inoculadas foram depositados sobre lâminas contendo ágar-água (2%). Após um período de cerca de 24 horas de incubação, em laboratório, o esporo que se encontrava isolado dos demais e que apresentava tubo germinativo em desenvolvimento foi coletado individualmente, com alça bacteriológica, sob microscópio óptico e transferido para o meio BDA. Os isolados monospóricos obtidos foram mantidos em BDA, EMDA (folha de erva-mate-dextrose-ágar: 200 g de infuso de folhas frescas de erva-mate, 20g de dextrose, 15g de ágar) e Meio de solo (areia, esterco de cavalo e solo, na proporção 1:1:1, de acordo com técnica proposta por McKeen & Wensley (1961).

## 2.3. Influência do meio de cultura no crescimento e esporulação dos isolados

Para comparar o crescimento micelial dos isolados, foram utilizados os seguintes meios de cultura: BDA, EMDA, CHDA (chimarrão-dextrose-ágar: 200g de

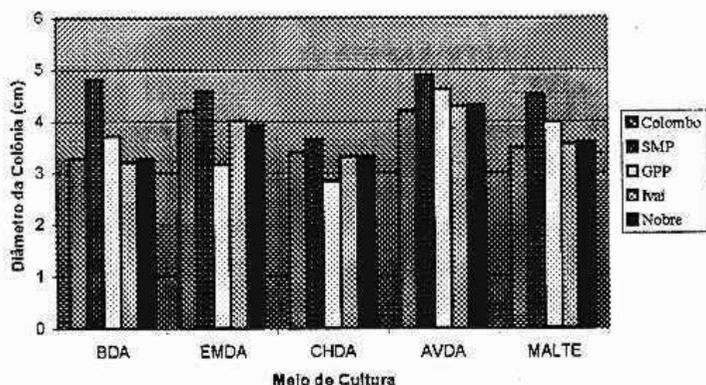
infusão de folhas de erva-mate processada e embalada para chimarrão, 20g de dextrose, 15g de ágar), AVDA (farinha de aveia-dextrose-ágar: 20g de farinha de aveia, 20g de dextrose, 15g de ágar), malte (extrato de malte-ágar: 20g de extrato de malte, 15g de ágar), Czapek (3,0g de Nitrato de Sódio, 1,0g de Fosfato de Potássio, 0,5g de Sulfato de Magnésio, 0,5g de Cloreto de Potássio, 0,01 g de Sulfato de Ferro, 30g de Sacarose e 15g de ágar. Os meios foram preparados para 1000 ml e o pH dos mesmos esteve em torno 5,0 a 5,5, exceto o meio de Czapek, que apresentou um pH em torno de 6,5.

Para a condução do ensaio, foram repicados blocos de colônia dos isolados monospóricos dos tubos para placas contendo os meios de cultura a serem testados. Este procedimento teve como objetivo adaptar o microrganismo aos diferentes meios. Após o crescimento da colônia nestas placas, por sete dias, blocos de meio de cultura com cerca de 5 mm de diâmetro foram retirados da região de crescimento ativo e transferidos para o centro das placas com os respectivos meios de cultura. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento (meio de cultura e isolado). O meio Czapek não foi utilizado por apresentar, em testes preliminares, crescimento insignificante das colônias. As avaliações de crescimento foram efetuadas aos sete e 14 dias após a inoculação, através da mensuração dos diâmetros em dois pontos da colônia. A taxa de esporulação foi avaliada aos 20 dias de incubação, lavando-se a superfície da colônia com 20 ml de água destilada e filtrando-se, em seguida, a suspensão em tecido de malha fina (uma camada). O número de esporos encontrado no filtrado foi quantificado em câmara de Neubauer.

Os ensaios foram conduzidos em condição ambiente no laboratório de Fitopatologia da *Embrapa Florestas*, onde a temperatura no período, variou entre 18°C e 30°C.

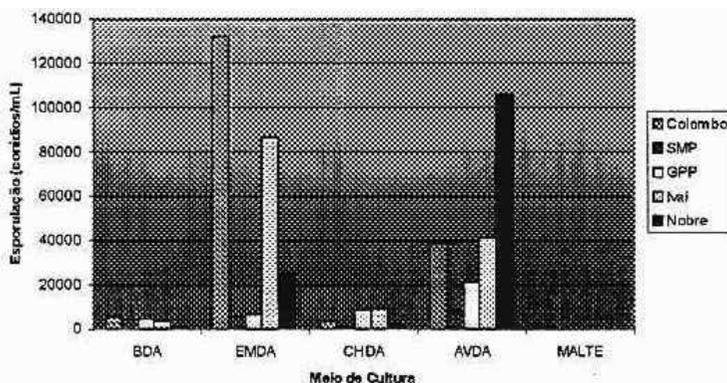
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados (Figura 1) revelam que, entre os isolados avaliados, aquele obtido em São Mateus (SMP) apresentou maior taxa de crescimento nos diferentes meios de cultura. No que se refere à avaliação entre meios de cultivo, o AVDA (aveia) e o EMDA (folha de erva-mate) promoveram, em média, um maior desenvolvimento dos isolados. O meio CHDA (infuso de chimarrão) resultou em culturas com as menores taxas de crescimento. O isolado de Guarapuava (GPP) foi um dos mais afetados quando cultivado neste meio.



**FIGURA 1.** Crescimento de colônias de isolados de *Cylindrocladium spathulatum* em diferentes meios de cultura, após 7 dias de incubação, em laboratório, 1997.

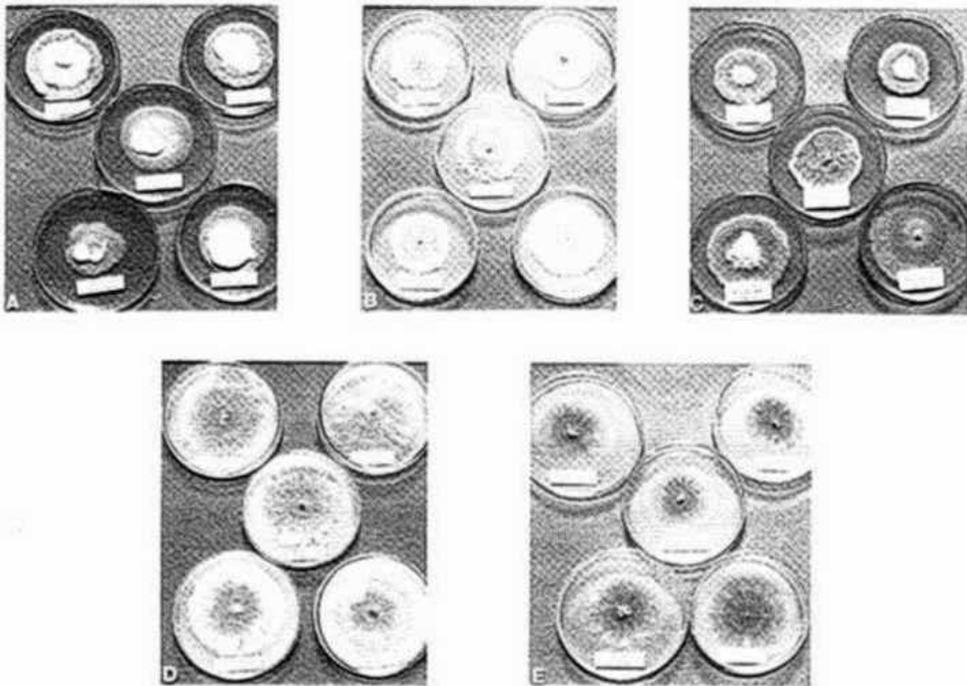
No que se refere à esporulação (Figura 2), dois meios de cultura se destacaram com as maiores contagens de conídios por mililitro: AVDA (aveia) e EMDA (folha de erva). Em cada meio de cultivo, foi possível observar variações na morfologia da colônia. Esta, porém, manteve-se semelhante entre os diferentes isolados (Figura 3). No meio BDA, ocorreu a produção de um micélio marrom-opaco e ralo. Este micélio foi ainda mais ralo no meio de malte. Um bom desenvolvimento de micélio foi observado nos meios de folha de erva e aveia. Neste último, formaram-se colônias de aspecto vigoroso, de coloração marrom e bordos esbranquiçados. As colônias produzidas em meio de infusão de chimarrão apresentaram-se muito irregulares, com setores de intenso crescimento micelial.



**FIGURA 2.** Esporulação de isolados de *Cylindrocladium spathulatum*, em diferentes meios de cultura, após 20 dias de incubação, em laboratório.

Apesar do meio de Czapek ter sido eficientemente utilizado para crescimento de *Cylindrocladium* sp. por Orrego Fuente et al. (1996), neste experimento, houve ausência ou pouco crescimento dos isolados em meio Czapek. Assim, a cultura

nesse meio não foi avaliada na segunda etapa do trabalho.. As prováveis disso seriam as diferenças de pH e da fonte de carbono. Enquanto que o pH nos demais meios esteve entre 5 e 5,5 , o meio Czapek tinha pH 6,5. Esse é o pH utilizado para ensaios de fisiologia e morfologia com outras espécies de *Cylindrocladium* (Reis, 1966; Hunter & Barnett, 1978). Quanto à fonte de carbono, o meio Czapek envolve sacarose, enquanto que os demais meios, envolve glicose. Sabe-se, porém, que espécies de *Cylindrocladium* utilizam diferentes fontes de carbono (Reis, 1966; Hunter & Barnett, 1978; Alfenas et al, 1979).



**FIGURA 3.** Aspectos morfológicos das colônias dos isolados de *Cylindrocladium. spathulatum*, nos meios de cultivo: A) CHDA (chimarrão-dextrose-ágar); B) BDA (batata-dextrose ágar); C) EMDA (folha de erva-mate-dextrose-ágar); D) AVDA (aveia-dextrose-ágar) e E) MALTE (malte-ágar). Placas com 12 dias de incubação, em laboratório, 1997.

A comparação entre os demais meios indicou o de aveia (AVDA) e folha de erva (EMDA) como os melhores para crescimento e esporulação dos isolados de *Cylindrocladium spathulatum*. O meio de aveia contém, em sua composição, além de minerais como P, Ca, Fe e Na, vitaminas do complexo B. A eficácia do meio de aveia para cultura de *Cylindrocladium* foi apontada, também, por Orrego Fuente et al. (1996), embora este autor tenha citado a formação de micélio ralo ao contrário do

observado no presente trabalho. O meio preparado a partir de folha de erva-mate representa uma boa alternativa para estudos de isolados de *Cylindrocladium*. Meios feitos a partir da planta hospedeira podem dar bons resultados, pois os nutrientes requeridos pelo patógeno estão contidos nos órgãos que eles colonizam. Alfenas et al. (1979), obtiveram boa produção de peritécios em meio contendo fragmentos de ramo de *Eucalyptus urophylla*. O meio CHDA preparado a partir de erva-mate processada para chimarrão (produto comercial), embora tenha resultado em baixas taxas de crescimento das colônias, permitiu alta taxa de esporulação, assim como os meios AVDA e EMDA, alta taxa de esporulação. O meio BDA, embora muito utilizado para manutenção e esporulação de *Cylindrocladium*, apenas permitiu o crescimento micelial, com baixa esporulação. A variação de resposta de esporulação pode ser dependente das espécies. Alfenas et al. (1979) verificaram boa esporulação no meio BDA em *C. crotalariae* e *C. scoparium*, enquanto que em *C. illicicola* a esporulação foi escassa. O meio de extrato de malte, embora seja utilizado como padrão para estudos de crescimento de colônias de *Cylindrocladium* (Crous & Wingfield, 1994), propiciou a formação de micélio ralo, sem esporulação.

Não houve esporulação uniforme de um mesmo isolado, cultivado em diferentes meios de cultura. O isolado Nobre foi o que melhor esporulou em AVDA. Entretanto, isto não se repetiu nos demais meios de cultura. As colônias, após lavadas apresentaram num período de 48 horas, alta taxa de esporulação nos meios AVDA, EMDA e CHDA. Os meios BDA e MALTE não propiciaram esporulação.

#### 4. CONCLUSÕES

Os meios de cultura à base de aveia e folha de erva-mate revelaram-se adequados para o cultivo e esporulação de culturas de *C. spathulatum*.

Existem diferenças, quanto ao crescimento das colônias, entre os isolados.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A.C.; MATSUOKA, A.K.; FERREIRA, F.A.; HODGES, C.S. Identificação, características culturais e patogenicidade de três espécies de *Cylindrocladium*, isoladas de manchas de folha de *Eucalyptus* spp. **Fitopatologia Brasileira**, v.4. p.445-459. 1979.

CROUS, P.; WINGFIELD, M.J.A monograph of *Cylindrocladium*, including anamorphs of *Calonectria*. **Mycotaxon**. v.51. p.341-435. 1994.

GRIGOLETTI, A. Jr.; AUER, C.G. Doenças da erva-mate: identificação e controle. Colombo: EMBRAPA/CNPF. 1996. 18p. (EMBRAPA-CNPF. Circular Técnica,25).

HUNTER, B.B.; BARNETT; H.L. Growth and sporulation of species and isolates of *Cylindrocladium* in culture. **Mycologia**. v.70. p.614-635. 1978.

MCKEEN, C.D.; WENSLEY, R.N. Longevity of *Fusarium oxysporum* in soil tube culture. **Science**, 134, n.3489, p.1528-1529. 1961.

ORREGO FUENTE, A.L.; MENEZES, M.; OLIVEIRA, S.M.A.; COELHO, R.S.B. Análise comparativa de caracteres patogênicos e fisis-morfológicos para identificação de espécies de *Cylindrocladium*. **Summa Phytopathologica**. v.22. n.2. p.1 27-133. 1996.

- REIS, M.S. Crescimento do micélio de *Cylindrocladium scoparium*, Morgan, em meio líquido de cultura contendo sete diferentes fontes de carbono. **Brasil Biológico**, v.26. p.329-334. 1966.
- RODIGHERI, H.R.; SCHLOSSNACHER NETO, L.; CICHACZEWSKI, I.F. Custo, produtividade e renda da erva-mate cultivada na região de Guarapuava, PR. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1996. 22p. (EMBRAPA-CNPQ. Circular Técnica, 24).
- ROWE, R.C.; BEUTE, M.K. Variability in virulence of *Cylindrocladium crotalariae* isolates on peanut. **Phytopathology**, v.65. p.422-425. 1975.