



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE FREQUÊNCIA DE ESTRUTURAS MORFOLÓGICAS DO AGENTE CAUSAL DA CROSTA-NEGRA-DO-ABACATEIRO

Paula Rodrigues Neves¹; Jennifer Decloquement²; Bruna do Carmo Vieira¹; Rafaela Souza Alves Fonseca¹; Natanael Marcos Lemes¹; Jakelanny Martins Silva¹, Roberto Pereira Castro Junior³, Milton Luiz da Paz-Lima¹.

¹IFGoiano Urutaí, Lab. de Microbiologia e Fitopatologia, CEP 75790-000, GO. fitolima@gmail.com; ² Institut Universitaire de Technologie de Béthune, CEP 62-400, Béthune, France, ³Basf, Rodovia BR 070, KM 266, sentido Barra do Garças, CEP 78600-000, Primavera do Leste - MT

RESUMO - O abacateiro é afetado por numerosas doenças que afetam raiz, caule e folhas. A crosta-negra-das-folhas-do-abacate tem incidência restrita e pouco comum no Brasil. O objetivo deste trabalho foi analisar a variabilidade morfológica e morfométrica, bem como identificar o agente causal da crosta-negra-do-abacateiro. Amostras de folhas sintomáticas, no ano de 2015, localizadas na cidade de Urutaí, GO, foram analisadas em microscópio estereoscópio. Neste, preparou-se lâminas semipermanentes e cortes histológicos para análise e visualização em microscópio composto. Realizou-se medições em microscópio de captura de imagens digital Nikon®. Fez-se análise de frequência de peritécio, asca e ascósporos, bem como, descreveu-se sua morfologia para comparação com descrição da espécie original. Sintomas: as lesões com pontuações escuras arredondadas na face adaxial, representadas pelo tecido estomático, circundadas por um halo amarelado, expandido por toda folha com o tempo, deixando-a clorótica. No centro das lesões foram observadas frutificações elevadas, globosas subepidérmicas, de coloração negra representados pelo estroma fúngico. Estroma anfigeno, elevado e organizado em camadas, de diâmetro de 1-5 mm. O peritécio apresentou internamente paráfises ramificadas e hialinas, ostiolados, subglobosos, de dimensões 67,4-(140,5)-199,3 x 45,6-(142,9)-313,7 µm, o ostíolo apresentou dimensões de 13,4-(53,6)-155,6 µm. A asca apresentou forma cilíndrica a clavada, de dimensões de 49,1-(81,7)-116,5 x 4,3-(8,3)-13,4 µm. Os ascósporos apresentaram forma elíptica, reta ou curvada, unicelular, não apresentou gútula oleosa interna, suas dimensões apresentaram 13,7-(18,6)-26,9 x 3,1- (5,9)-9,7 µm. Com base na análise de frequência as medidas de comprimento e largura da asca e ascósporos, podem ser consideradas confiáveis como critério taxonômico de identificação. Com base na análise morfológica e morfométrica o isolado foi identificado como *Phyllachora perseae*.

Palavras-chave: *Persea americana*, abacate, *Phyllachora perseae*.

INTRODUÇÃO

O abacateiro (*Persea americana* - Lauraceae) é originário da América e é cultivado em quase todas as regiões tropicais e subtropicais, particularmente no México, América Central,



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA **Instituto Agrônomo - Campinas, SP**

7 a 9 de Fevereiro de 2017

partes da América do Sul, nas Índias Ocidentais, África do Sul, Israel e no Havaí; em menor extensão, na Índia, Samoa, Taiti, Argélia, Austrália e EUA (OLIVEIRA et al., 2000).

O abacate é um fruto climatérico, com alta taxa respiratória e produção elevada de etileno após a colheita; portanto, altamente perecível sob condições ambientais. O controle do amadurecimento é fundamental para o aumento da vida útil após colheita, visando ao mercado interno e à exportação de frutas. Já a comercialização do fruto na forma processada é um grande desafio, pois a polpa escurece rapidamente depois de cortada, por presença de enzimas responsáveis pelo escurecimento, principalmente a polifenoloxidase (DAIUTO et al., 2011).

As qualidades organolépticas, o valor nutritivo e a riqueza em vitaminas do abacate justificam plenamente a expansão do seu consumo. O abacate contém as vitaminas lipossolúveis que em geral faltam nas outras frutas. É muito rico em vitaminas A e B, medianamente rico em vitaminas D e E e muito pobre em vitamina C. O valor calórico por 100 gramas de fruto pode variar de 55 a 200 calorias (OLIVEIRA et al., 2000).

O abacateiro é afetado por numerosas doenças que infectam raiz, caule e folhas. Dentre essas doenças, as mais encontradas em abacateiro podemos encontrar a podridão das raízes causada por *Phytophthora cinnamoni*, a verrugose (*Sphaceloma perseae*) ou a cercosporiose com agente causal conhecido como *Pseudomonas purpurea* e *Cercospora perseae* (PICCININ et al., 2005). A crosta-negra-das-folhas-do-abacate tem incidência restrita e pouco frequente na natureza. O objetivo deste trabalho foi analisar a variabilidade morfológica e morfométricas, bem como identificar o agente causal da crosta-negra-do-abacateiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de folhas sintomáticas de abacate, no ano de 2015, localizadas na cidade de Urutaí, GO, foram analisadas em microscópio estereoscópio. Neste preparou-se laminais semipermanentes e cortes histológicos para análise e visualização em microscópio composto. Foi aplicado o método da “pescagem direta” onde utilizou-se pinça e estilete, e os propágulos do patógeno foram transferidos para lâminas contendo fixador lactofenol (200 mL.L⁻¹ fenol fundido, 200 mL.L⁻¹ ácido láctico; 400 mL.L⁻¹ glicerina branca; 0,5 h.L⁻¹ azul de algodão; 200 mL.L⁻¹ água purificada). Foi aplicado o método do “corte histológico” utilizando lâmina de barbear realizando cortes transversais do tecido fúngico evidenciando peritécios. Estes cortes foram transferidos para lâminas contendo fixador lactofenol (200 mL.L⁻¹ fenol fundido, 200 mL.L⁻¹ ácido láctico; 400 mL.L⁻¹ glicerina branca; 0,5 h.L⁻¹ azul de algodão; 200 mL.L⁻¹ água purificada). As lâminas foram vedadas com esmalte para unhas. Estruturas fúngicas representadas por peritécio, estroma, asca e ascósporos foram caracterizadas morfológica e morfometricamente, procurando comparar com a descrição original das espécies registradas para a cultura do abacate no mundo que são *P. gratissima*, *P. perseae* e *P. maculicola*. Realizaram-se medições em microscópio de captura de



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

imagens digital Nikon. Fez-se análise de frequência dos dados morfométricos, bem como, descreveu-se sua morfologia que foram tabulados para estudo da variabilidade morfológica e comparação com descrição original para a espécie descrita na hospedeira.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sintomas: na face adaxial, observaram-se necroses de coloração marrom à pálea, com halos cloróticos, acompanhando as nervuras secundárias, nota-se confluência das lesões partindo da margem para o centro do mesófilo. Na face abaxial, o tecido estomático não é abundante, apresenta-se de forma esférica, alongada e confluyente, partindo e acompanhando as nervuras; observou-se a presença de halos cloróticos ao redor dos sinais, seguido de necroses de formato irregular e coloração marrom escura a negra, não recoberto por tecido fúngico (Figura 1).

Sinais: O isolado oriundo de Urutaí, GO, apresentou estroma anfígeno, elevado e organizado em camadas, de diâmetro de 1-5 mm, apresentou superfície lisa a irregular, os estromas apresentavam pequenas confluências, sendo que na face adaxial foliar apresentou coloração marrom-pálea e na face abaxial apresentou coloração negro-opaco. O peritécio apresentou internamente paráfises ramificadas e hialinas, ostiolados, subglobosos, de dimensões 67,4-(140,5)-199,3 x 45,6-(142,9)-313,7 μm , o ostíolo apresentou dimensões de 13,4-(53,6)-155,6 μm . A asca apresentou forma cilíndrica a clavada, de dimensões de 49,1-(81,7)-116,5 x 4,3-(8,3)-13,4 μm , apresentou 8 ascósporos por asca, organizados em uni ou bisserie. Os ascósporos de coloração quando jovem hialino e quando maduro feo, apresentavam forma elíptica, reta ou curvada, unicelular, não apresentou gútula oleosa interna, suas dimensões apresentaram 13,7-(18,6)-26,9 x 3,1- (5,9)-9,7 μm (Fig. 2).

O isolado Urutaí (2015) não foi adequado a *P. gratissima* por este último apresentar estroma epifilo, superfície verruculosa, ascas elípticas, presença de gútula; e a largura dos ascósporos é superior. O isolado de Urutaí (2015) não foi adequado a *P. maculicola* por este último apresentar estroma de diâmetro superior, de coloração escuro e brilhante na face adaxial, o comprimento do peritécio encontra-se superior, a coloração dos ascósporos é hialina, o comprimento do ascósporo é superior e a largura do ascósporo é inferior. Desta forma o isolado desconhecido apresentou maior número de características concordantes com *P. perseae* por apresentar peritécio ostiolado, de forma subglobosa, dimensões do peritécio similares, forma da asca cilíndrica a clavada, dimensões similares das ascas, apresentar 8 ascósporos por asca de organização uni ou bisseriada, ascósporos de forma elíptica, reta ou curvada, unicelulares quando jovens de coloração hialina e quando maduro feo e por fim por apresentar dimensões dos ascósporos enquadradas em suas amplitudes (Tab. 1).

Com base na frequência observada o comprimento e largura da asca e do ascósporo, apresentaram amplitudes mais frequentes de 62,0-103,0 μm , 6,1-9,8 μm , 16,0-18,9 μm e 4,4-7,1



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA
Instituto Agrônomo - Campinas, SP
7 a 9 de Fevereiro de 2017

µm, respectivamente. Estas variáveis morfométricas apresentaram distribuição Normal, ou seja, podem ser confiáveis como critério taxonômico de identificação de espécie (Fig. 3).

Tabela 1. Características morfológicas e morfométricas de *Phyllachora* sp. incidente em folhas de abacateiro com as espécies *P. perseae* e *P. maculicola*, ambas descritas para o abacate.

Características morfológicas	Isolado de Abacateiro -Urutai (GO)	<i>P. perseae</i> Hodges (1969)	<i>P. maculicola</i> Syd. (1916)
Estroma			
Presença e posição estroma	anfígeno elevado e em camadas	epífilo, elevado em camadas	anfígeno, punctiforme e em camadas
Diâmetro do estroma (mm)	01-mai	0,75-1	05-oct
Superfície do estroma	lisa a irregular	orbiculado	nd
Espessura do estroma (mm)	nd	nd	0,25-0,4
Confluência do estroma	presente	nd	Presente
Coloração	Adaxial paleo a marrom e abaxial negro e opaco	nd	adaxial escuro e brilhante, e abaxial escuro e opaco.
Peritécio			
Presença de paráfises	ramificadas e hialinas	nd	Presente
Numero de peritécios imersos	nd	nd	nd
Presença de ostíolo	presente	presente	nd
Forma do peritécio	subglobosa	subglobosa	globoso
Dimensões (µm)	67,4-(140,5)-199,3 x 45,6-(142,9)-313,7	175-(210)-300 x 150-(170)-185	200-250
Diâmetro do ostíolo (µm)	13,4-(53,6)-155,6	nd	nd
Presença de clipeo (escudo concavo)	nd	presente	presente
Tamanho do clipeo (µm)	nd	nd	20-30
Asca			
Forma da asca	cilíndrica e clavadas	clavada, cilíndrica	cilíndricas a clavadas
Dimensões (µm)	49,1-(81,7)-116,5 x 4,3-(8,3)-13,4	80-100 x 10-15	80-100 x 12-15
Numero de ascósporos por asca	8	8	8
Posicionamento na asca dos ascósporos	uni ou bisseriados	uni ou bisseriados	nd
Ascósporos			
Forma	elíptico, reto ou curvado	reto ou curvado	fusóide
Número de células	unicelular	unicelular	nd
Presença de gútula oleosa interna	Ausente	nd	nd
Coloração	jovem hialino e maduro feo	jovem hialino e maduro feo	hialino
Dimensões (µm)	13,7-(18,6)-26,9 x 3,1-(5,9)-9,7	21,0-(32,2)-39,5 x 3,6-(5,5)-7,0	20-24 x 4-4,5



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA
Instituto Agrônomo - Campinas, SP
7 a 9 de Fevereiro de 2017

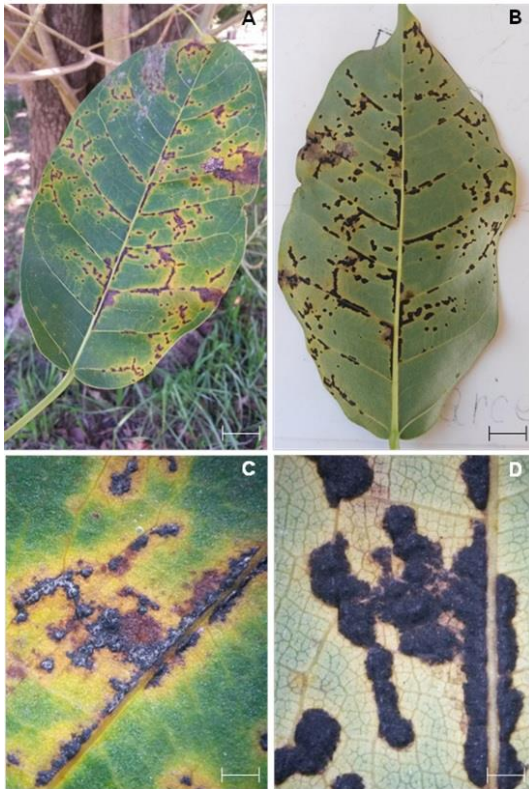


Figura 1. Sintomas da crosta-marrom-do-abacate (*Persea americana*) causada por *Phyllachora* sp. A. Sintomas na face adaxial (barr= 2,25 cm). B. Sinais na face abaxial (barr= 2,2 cm), C. sinais na face adaxial circundados por halo clorótico (barr= 10 mm), D. sinais na face abaxial formando abundante tecido estromático, negro, crostoso e superficial (barr= 5 mm).

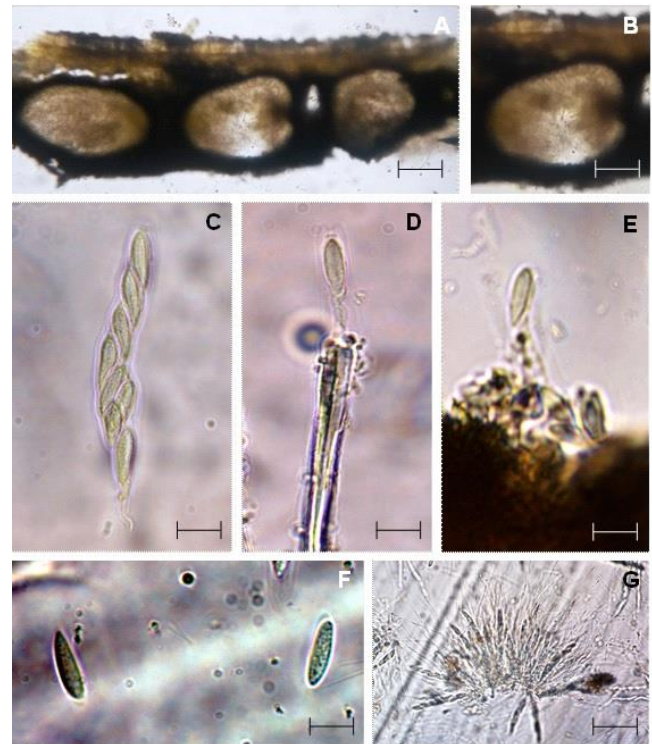


Figura 2. Sintomas da crosta-marrom-do-abacate (*Persea americana*) causada por *Phyllachora* sp. A. Múltiplos peritécios localizados na superfície da face adaxial foliar (barr= 45 μ m), B. Peritécio não estiolado (barr= 45 μ m), C. Asca hialina contendo oito ascósporos (barr= 20 μ m), D. Região apical da asca (barr= 20 μ m), E. Saída da asca do corpo de frutificação (peritécio) (barr= 18 μ m), F. Ascósporos elípticos (barr= 15 μ m), G. conjunto de ascas (barr= 75 μ m).



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA
Instituto Agrônomo - Campinas, SP
7 a 9 de Fevereiro de 2017

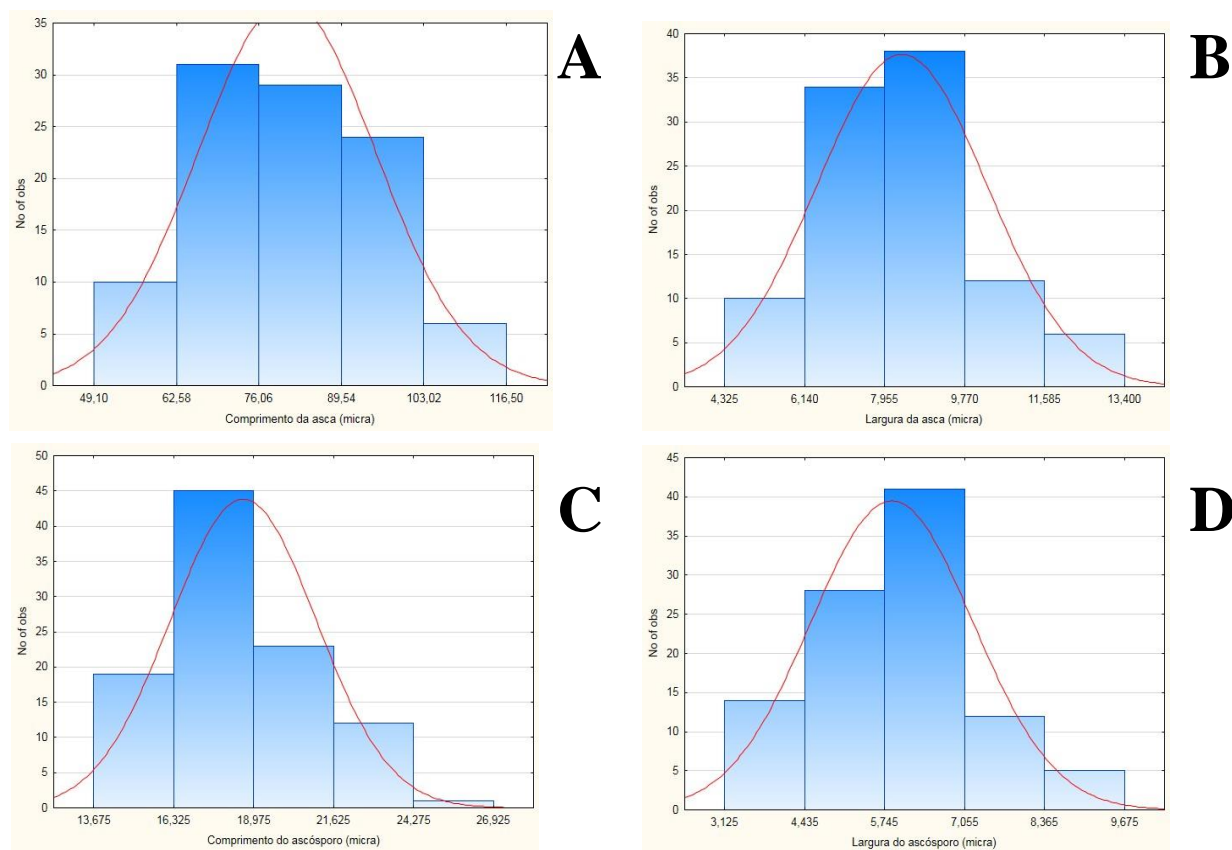


Figura 3. Frequência observada do comprimento e largura da asca e ascósporos de *Phyllachora* sp. incidente em folhas de abacateiro (*Persea americana*). **A.** comprimento da asca, **B.** largura da asca, **C.** comprimento do ascósporo, **D.** Largura do ascósporo.

CONCLUSÃO

Com base na análise de frequência as medidas de comprimento e largura da asca e ascósporos, podem ser consideradas confiáveis como critério taxonômico de identificação. Com base na análise morfológica e morfométrica o isolado foi identificado como *P. perseae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DAIUTO, E.R.; VIEITES, R.L.; CARVALHO, L.R.; SIMON, J.W.; RUSSO, V.C. Avaliação sensorial do guacamole com adição de alfa tocoferol e ácido ascórbico conservado pelo frio. *Revista Ceres*, v. 58, p. 140-148, 2011.

HODGES, C.S. A new species of *Phyllachora* on *Persea*. *Mycologia* v.61, n.4, p. 838-840. 1969.

INDEX FUNGORUM, banco de dados para consulta de táxons fúngicos. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp> . Acessado 14 de novembro de 2016.



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA
Instituto Agrônomo - Campinas, SP
7 a 9 de Fevereiro de 2017

MYCOBANK, International Micological Association, Disponível em: https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/fungushost/new_frameFungusHostReport.cfm, acessado 14 de novembro de 2016.

OLIVEIRA, M.A.; SANTOS C.H.; HENRIQUE C.M.; RODRIGUES J.D.. Ceras para conservação pós-colheita de frutos de abacateiro cultivar fuerte, armazenados em temperatura ambiente. *Scientia Agrícola*, São Paulo, v.57, n.4, p.777-780. 2000.

PICCININ E.; PASCHOLATI S.F.; DI PIERO R.M. Doenças do abacateiro (*Persea americana*). Manual de fitopatologia, doenças das plantas cultivadas, São Paulo-SP, v.2, p. 663, 2005.

SYDOW *Phyllachora maculicola* *Annales Mycologici*, v. 14 n.1-6, p. 83, 1916.