



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

***Colletotrichum fructicola*, PATÓGENO CAUSADOR DE SEVERA DESFOLHA EM ROMÃZEIRAS E MANCHAS NECRÓTICAS EM FOLHAS E FRUTOS**

Margarida Fumiko Ito¹; Vinicius Henrique Bello²; Nobuyoshi Narita³; Valdir Atsushi Yuki¹

¹Instituto Agronômico (Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade/Fitopatologia/Virologia), C.P. 28, 13001-970, Campinas-SP, mfito@iac.sp.gov.br; vayuki@iac.sp.gov.br; ²Faculdade de Ciências Agrônomicas, UNESP, Rua José Barbosa de Barros 1780, 18610-307, Botucatu-SP, vhbello@hotmail.com; Polo Alta Sorocabana/APTA, C.P. 298, 19015-970, Presidente prudente-SP, narita@apta.sp.gov.br

RESUMO - Realizou-se um levantamento da doença que vem causando drástica desfolha na cultura de romã, causando ainda manchas necróticas nas folhas e nos frutos, no município de Presidente Prudente, SP e regiões vizinhas. O objetivo foi diagnosticar o patógeno causador dessa doença, que vem ocorrendo há alguns anos nessa região produtora. Foram coletadas amostras de folhas e frutos com sintomas, que foram analisadas no Laboratório de Fitopatologia, do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade, do Instituto Agronômico (IAC)/APTA/SAA. O isolamento foi realizado em meio de cultura BDA. Os fungos desenvolvidos e suas estruturas reprodutivas foram observados em microscópios estereoscópico e ótico e foi também realizada a análise molecular, no Laboratório de Virologia Vegetal (UNESP - Botucatu), além da inoculação em plantas de romã. Os isolados reproduziram os mesmos sintomas observados no campo e no re-isolamento foram obtidos fungos com as mesmas características dos inoculados. Na análise molecular baseada na região ITS, quando comparado à sequência por BLASTn no GenBank, o fungo apresentou identidade de 99 % com os isolados de *Colletotrichum fructicola*, KX0007499 e LT632564. Concluiu-se que o patógeno causador da doença antracnose em romã é o fungo *C. fructicola*.

Palavras-chave: *Punica granatum* L., antracnose, ocorrência.

INTRODUÇÃO

A romã (*Punica granatum* L.), como fruta e planta, é muito apreciada pelas suas qualidades alimentares, medicinais e ornamentais. Langley (2000) cita que a romã tem sido considerada sagrada pelas principais religiões do mundo, devido às propriedades medicinais (citado por SUZUKI, 2016).

Segundo Watanabe & Oliveira (2014), houve grande crescimento no volume comercializado de romã no Brasil, nos últimos anos. O estado de São Paulo participa com mais de 90 % da comercialização nacional, sendo os municípios de São Paulo, Taquaritinga, Álvares Machado, Valinhos, e Presidente Prudente, os principais municípios produtores, com destaque a São Paulo e Taquaritinga (SUZUKI, 2016).

No município de Presidente Prudente, SP e regiões vizinhas, desde há alguns anos, vem sendo observada uma doença causando drástica desfolha das plantas de romã, nos



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

cultivos comerciais, principalmente nas épocas chuvosas, quando prevalecem a alta umidade e a temperatura mais elevada.

Além da desfolha, foram observadas nas folhas pequenas manchas necróticas e nos frutos as manchas necróticas variavam de 1 mm a 4 mm, depreciando o produto e reduzindo a produtividade. Cardoso et al. (2010) observaram severas lesões na parte aérea de plantas adultas de romãzeiras, no município de Limoeiro do Norte, CE, e denominaram a doença como antracnose.

O objetivo do trabalho foi identificar o patógeno causador de manchas nas folhas e nos frutos de romã.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas visitas aos produtores de romã, no município de Presidente Prudente, SP e regiões vizinhas, em 2015/16, com problemas fitossanitários nas suas lavouras. Há alguns anos, vem ocorrendo uma doença nas culturas dessa região, severidade extremamente alta, que deixam as plantas quase que totalmente desfolhadas (Figura 1).



Figura 1. Desfolha de plantas de romã, causada por *Colletotrichum fructicola*, no município de Presidente Prudente, SP.

Amostras foliares e frutos de romã apresentando sintomas da doença foram coletados em cultivos comerciais, na safra 2015/2016, nos municípios de Presidente Prudente, SP e Álvares Machado, SP, num total de oito amostras. Essas amostras foram analisadas no Laboratório de Fitopatologia, do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade, do Instituto Agronômico (IAC/APTA/SAA), em Campinas, SP.



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

Para o diagnóstico do patógeno, as folhas e frutos com sintomas da doença foram lavados em água corrente e secos em papel toalha. A partir desse material, foi realizado o isolamento do patógeno. Foram obtidos fragmentos da área de transição tecido doente/tecido sadio de cada amostra. Esses fragmentos foram passados em álcool etílico a 70% durante 10 segundos, tratados com hipoclorito de sódio a 0,2% por 90 segundos e distribuídos cinco fragmentos em placa de Petri contendo o meio de cultura BDA (Batata, Dextrose, Agar). Para cada isolamento foram utilizadas três placas de Petri. As placas assim preparadas foram mantidas em câmara de incubação até o desenvolvimento do patógeno, em temperatura ao redor de 28 °C.

A morfologia da colônia dos fungos desenvolvidos e as estruturas reprodutivas foram avaliadas nos microscópios estereoscópico e ótico, para a determinação do patógeno.

Para o teste de patogenicidade, os isolados monospóricos obtidos foram repicados em placas de Petri contendo o meio de cultura aveia ágar (30 g de aveia, 20 g de ágar, completados a 1.000 mL com água destilada). As placas assim preparadas foram mantidas em câmara de incubação por sete dias, em temperatura ao redor de 28 °C. Após esse período, foi preparado o inóculo adicionando-se água destilada e esterilizada sobre a superfície da colônia e sua leve raspagem com lâmina de vidro. A suspensão de micélio e esporos foi filtrada numa peneira metálica de malha bem estreita e a concentração foi ajustada a $1,2 \cdot 10^6$ esporos.mL⁻¹.

Três plantas de romã com seis meses de idade, contidas em sacos plásticos com substrato, foram inoculadas com culturas monospóricas de um isolado de fruto e um isolado de folha, números 15130-1 e 15131-1, respectivamente, registrados no Livro de Registro de Material do Centro de Fitossanidade/IAC.

A inoculação foi realizada por pulverização do inóculo em toda parte aérea da planta. O mesmo número de plantas foi pulverizado com água destilada e esterilizada, como tratamento testemunha. As plantas foram mantidas em câmara úmida por 48 horas, em casa-de-vegetação, onde a temperatura variou de 25 °C a 30 °C. Procurou-se manter alta umidade no ambiente depois da saída da câmara úmida, através de várias pulverizações de água durante o dia.

Além da caracterização morfo-cultural, o fungo foi identificado molecularmente com base nas sequências parciais da região ITS. Estas sequências foram amplificadas por PCR utilizando o par de primer universal (WHITE et al., 1990) ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') no qual amplificam um fragmento de 560 bp. Reações de PCR de 50 µL foram amplificadas em



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

termociclador (Eppendorf máster cycler) com inicial desnaturação a 95°C por cinco minutos, e 34 ciclos com desnaturação a 94 °C por 60”, anelamento a 55 °C por 60”, e extensão final a 72 °C por 90”, com uma extensão final a 72 °C por cinco minutos. Os produtos amplificados de PCR foram separados em um gel de agarose a 0,8 % utilizando-se o tampão Tris-Borate-EDTA (TBE), corado com brometo de etídio (0,5 µg.mL⁻¹) e visualizados em UV.

Os fragmentos amplificados foram purificados e enviados para sequenciamento (Macrogen – Korea, Seoul) para serem comparados com outras sequências do fungo depositadas no GeneBank, utilizando-se o programa BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas plantas inoculadas, com os isolados monospóricos 15130-1 e 15131-1, o fungo desenvolveu-se rapidamente, tendo-se observado o início dos sintomas a partir do terceiro dia da inoculação. Aos sete dias, as folhas já se apresentavam com alta severidade da doença, com início da desfolha e ao redor de 10 dias as plantas já estavam muito desfolhadas (Figura 2), como observado no campo. Os fungos inoculados foram re-isolados e apresentaram as mesmas características dos fungos inoculados, confirmando-se o postulado de Koch.



Figura 2. Sintomas de antracnose em plantas de romã, causados por *Colletotrichum fructicola*, após inoculação do patógeno: A. Planta inoculada. B. Testemunha.



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

A análise molecular baseada na sequência parcial da região ITS, quando comparada por BLASTn no GenBank, o isolado 15130-1 apresentou uma identidade de 99 % com a sequência de *C. fruticola* da China (LT632564), e o isolado 15131-1 de *C. fruticola* apresentou uma identidade de 99 % com a sequência do fungo da Índia (KX000499). Estes resultados revelaram ser o agente causal da doença em romã o fungo *Colletotrichum fruticola*.

Os sintomas observados nas romãzeiras do município de Presidente Prudente, SP e regiões vizinhas e os danos na cultura são semelhantes aos observados por Cardoso et al. (2010), no município de Limoeiro do Norte, CE, assim como os conídios, que apresentaram características semelhantes.

CONCLUSÃO

A doença antracnose em folhas e frutos nas culturas de romã, no município de Presidente Prudente, SP e regiões vizinhas é causada pelo patógeno *Colletotrichum fruticola*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARDOSO, J.E.; SILVA, J.L.; MARTINS, M.V.V.; MOREIRA, R.C.; VIANA, F.M.P.; CHAVES, L. G.; ALVES, E.S.; LIMA, F.A.; VIDAL, D. Ocorrência e controle químico da antracnose em plantio comercial da romãzeira no estado do Ceará <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/870483/1/AT10076.pdf>. 2010. Acesso em 20/12/2016.

LANGLEY, P. Why a pomegranate?. *British of Medicine Journal*, v.321, n.4, p.1153-4. 2000.

SUZUKI, E.T.; SAMPAIO, A.C. Avaliação fenológica, análise econômica e estudo da cadeia produtiva da romã (*Punica granatum*). Tese (Doutorado). UNESP/Botucatu. 110p. 2016.

WATANABE, H.S.; OLIVEIRA, S.L. Comercialização de frutas exóticas. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, v. 36, n.1, p. 23-38, mar. 2014.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds) *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego, p. 315-322. 1990.