

## Ocorrência de *Colletotrichum gloeosporioides* em camélia no Brasil<sup>(1)</sup>

MARÍLIA LAZAROTTO<sup>(2)</sup>; CACIARA GONZATTO MACIEL<sup>(3)</sup>;  
MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ<sup>(4)</sup>

### RESUMO

A camélia (*Camellia japonica*) é uma espécie muito cultivada em vários países do mundo, incluindo o Brasil, como espécie ornamental, em jardins públicos e residenciais. Na primavera de 2011, foram observadas, no campus da Universidade Federal de Santa Maria, em Santa Maria (RS), que plantas desta espécie apresentavam ataque intenso nas folhas com manchas foliares muito peculiares e de etiologia até então desconhecida. Constatou-se que se tratava de um fungo, que foi isolado em meio específico e, posteriormente, sua patogenicidade foi testada em folhas destacadas, com aplicação de gotas de suspensão na concentração de  $2,0 \times 10^6$  esporos/mL, com quatro repetições de duas folhas, para a inoculação e para o tratamento controle. O fungo foi caracterizado morfológicamente, com medição de diâmetro e comprimento de 20 conídios. Após, foi realizada identificação molecular através da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), seguida de sequenciamento da região ITS. O isolado mostrou-se patogênico, com ocorrência dos sintomas, aos dez dias da inoculação. Morfológicamente, foi identificado como *Colletotrichum* sp. com médias de 4,88  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 12,25  $\mu\text{m}$  de comprimento; sua espécie foi determinada molecularmente como *Colletotrichum gloeosporioides*. Este fungo já foi relatado para a espécie ornamental em outros países, porém este é o primeiro relato de ocorrência no Brasil. **Palavras-chave:** caracterização morfológica, PCR, patogenicidade.

### ABSTRACT

#### Occurrence of *Colletotrichum gloeosporioides* on *Camellia japonica* in Brazil

*Camellia japonica* is cultivated in several countries, including Brazil, such as ornamental tree in public parks and residential gardens. In the spring of 2011 on the campus of Federal University of Santa Maria, plants of *Camellia japonica* showed intense attack on leaves with very peculiar leaf-spots which etiology was unknown. It was found that it was a fungus, which was isolated in a specific medium and then tested for pathogenicity leaves by applying drops of suspension at a concentration of  $2.0 \times 10^6$  spores/ mL, with four repetitions of two leaves to inoculation and for the control treatment. The fungus has been morphologically characterized, measuring diameter and length of 20 conidia. Therefore, molecular identification was performed by Polymerase Chain Reaction (PCR), followed by sequencing the ITS region. The isolate proved to be pathogenic, with the occurrence of symptoms 10 days after inoculation. Morphologically, was identified as *Colletotrichum* sp. average 4.88  $\mu\text{m}$  in diameter and 12.25  $\mu\text{m}$  in length; its molecular species was determined as *Colletotrichum gloeosporioides*. This fungus has been reported for this ornamental specie in other countries, but this is the first report of its occurrence in Brazil.

**Keywords:** morphological characterization, PCR, pathogenicity.

A camélia (*Camellia japonica* L.) é uma espécie da família Theaceae e abrange um grupo muito variado de arbustos e árvores ramificados, atingindo de 1,5 m a 6 m de altura, originários do Japão, China e Coréia, com folhagem e florescimento decorativos (LORENZI e SOUZA, 2008). Para estes autores, a camélia é uma planta de clima temperado, porém, a variedade de flores brancas dobradas tolera climas mais quentes. A planta é muito utilizada como ornamental em jardins residenciais e áreas públicas, com floração abundante e exuberante, de coloração variada.

Segundo ALEXANDRE et al. (2005) o controle de doenças, principalmente vírus e pragas, é um pré-requisito para o desenvolvimento da indústria da horticultura ornamental, que está baseado no suprimento de flores e plantas de alta qualidade. Neste caso a identificação adequada dos problemas fitossanitários que atingem

determinada espécie é fundamental para o êxito na produção.

VÁZQUEZ et al. (2002) descreveram os problemas fitossanitários de *Camelia* sp. em Portugal e, dentre as doenças causadas por fungos, podem ser relatadas: murcha-da-flor-da camélia causada por *Ciborinia camelliae*; mancha-de-pestalotia, causada por *Pestalotia guepinii*, doença comum que afeta folhas, botões florais e gemas vegetativas; podridão-cinzenta causada por *Botrytis cinerea*, que se encontra sobretudo, na flor da camélia, colonizando as pétalas e sépalas secas; mancha-foliar causada por *Phomopsis camelliae-japonicae*; fumagina causada por *Meliola camelliae*, cobrindo folhas da espécie; *Alternaria* sp. atacando folhas, flores e ramos; *Cytospora* sp. fungo que produz frutificações em forma de picnídios que emitem cirros sobre ramos debilitados de camélias

<sup>(1)</sup> Recebido em 10 de maio de 2013 e aceito para publicação em 30 junho de 2013.

<sup>(2)</sup> lilalazarotto@yahoo.com.br

<sup>(3)</sup> caciara gonzatto@gmail.com

<sup>(4)</sup> marlovedmuniz@yahoo.com.br

completamente desfolhadas; e ainda *Colletotrichum gloeosporioides*, sendo que o sintoma mais característico da doença começa com a necrose da extremidade dos ramos mais jovens, seguida de uma necrose de toda a parte afetada. O mesmo foi detectado nas folhas e nos ramos de camélias e os sintomas observados foram manchas castanhas nos ramos e folhas. O gênero *Colletotrichum* é um dos mais importantes entre os fungos fitopatogênicos do mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Esse patógeno envolve espécies que causam doenças de expressão econômica em leguminosas, cereais, hortaliças e culturas perenes, incluindo diversas frutíferas (SERRA et al., 2008).

Para identificação de espécies de *Colletotrichum* utiliza-se, quase que exclusivamente, de caracterização morfológica, cultural e molecular. Características como morfologia de conídios, presença ou ausência de setas, formação de apressórios, presença ou ausência de teleomorfo, coloração da colônia e taxa de crescimento micelial são as mais utilizadas (SERRA et al., 2008). Entretanto, ferramentas moleculares são muito utilizadas atualmente e são imprescindíveis para a confirmação de espécies fúngicas. Uma das técnicas moleculares amplamente utilizadas para a identificação de fungos é a da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), que permite a amplificação de fragmentos específicos de DNA de células fúngicas, vivas ou mortas, mesmo que estejam misturados a outros DNA's (PINHEIRO, 2004).

Durante a primavera de 2011, verificou-se a ocorrência de manchas foliares em plantas de *Camellia japonica*, no Campus da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em Santa Maria – RS. Este trabalho teve objetivo de identificar o agente causal da mancha foliar em camélia.

Os sintomas verificados foram manchas foliares necróticas com diferentes tamanhos e formas, com halo escurecido, centro acinzentado e presença de pontuações escuras no centro da lesão (Figura 1- A) e em lupa, foi possível a visualização de acérvulos (Figura 1 – B). O fungo relacionado ao sintoma foi imediatamente isolado em meio Mathur (MATHUR et al., 1950), constituído por peptona (2,0g/L), dextrose (2,8g/L), MgSO<sub>4</sub> (1,73g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2,72g/L) e ágar (20g/L), para experimentos posteriores. O material diretamente isolado das folhas atacadas foi utilizado para identificação do patógeno através de descrições de BARNETT e HUNTER (1972).

O isolado foi então utilizado no teste de patogenicidade, efetuado em folhas destacadas de camélia. A partir de uma cultura pura do fungo desenvolvida em meio Mathur, produziu-se uma suspensão de 2,0 x 10<sup>6</sup> esporos/mL que foi inoculada em folhas destacadas de camélia. Para a inoculação, colocou-se duas gotas de um µL da suspensão com auxílio de uma pipeta graduada, sobre a parte abaxial da folha, enquanto que para as folhas controle foram colocados apenas duas gotas de um µL de água esterilizada. Foram utilizadas quatro repetições de duas folhas para a inoculação e o mesmo para o controle.

Após a aplicação da suspensão na forma de gotas, as folhas de camélia permaneceram incubadas em caixas de plástico (*gerbox*), tendo como substrato duas folhas de papel-filtro esterilizado e umedecido com água destilada

esterilizada, mantidas a uma temperatura de 25±3 °C e fotoperíodo de 12 horas até o aparecimento dos sintomas. Após, as culturas foram reisoladas em meio Mathur.

Posteriormente à confirmação da patogenicidade e reisolamento do patógeno, este foi caracterizado com base na morfologia e dimensão das estruturas reprodutivas mensurando-se o diâmetro e comprimento de 20 conídios.

Com base em caracteres morfológicos, o isolado foi identificado apenas quanto ao gênero. Por isso, este foi então identificado molecularmente, com a extração do DNA genômico, submissão deste à Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) para a amplificação da região ITS do rDNA com os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4. O sequenciamento foi realizado em sequenciador Mega BACE 500 (Amersham). A similaridade das sequências de nucleotídeos entre os isolados foi calculada através do Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Com o material isolado diretamente das folhas atacadas foi possível identificar o fungo *Colletotrichum* sp. como agente causal da doença.

As folhas inoculadas com o isolado de *Colletotrichum* sp. apresentaram manchas foliares dez dias após a inoculação (Figura 1 – C), enquanto que as folhas controle permaneceram livres de sintomas. As culturas reisoladas, após o teste de patogenicidade, foram semelhantes às originais, confirmando a patogenicidade do isolado através dos Postulados de Koch.

Com a caracterização morfológica, observou-se que os conídios apresentaram forma elíptica, hialina e unicelular. Estes apresentaram as dimensões médias de 4,88 µm de diâmetro e 12,25 µm de comprimento. Verificaram-se a presença de setas, características de fungos do gênero *Colletotrichum* (Figura 1 – D).

Através do sequenciamento e comparação da sequência obtida com as disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), foi possível identificar o isolado como *Colletotrichum gloeosporioides*, com 99% de similaridade com outros acessos da espécie disponíveis no banco de dados e 99% de cobertura da sequência.

*Colletotrichum gloeosporioides* já foi encontrado associado a outras espécies utilizadas como ornamentais. LINS e COELHO (2004) encontraram o patógeno associado a diversas espécies ornamentais tropicais em Pernambuco. Segundo esses autores, o fungo pode atacar as espécies de *Heliconia* (helicônias), *Etilingera elatior* (bastão-do-imperador) e *Tapeinochilos ananassae* (tapeinóquilos); CARNAÚBA et al. (2007) relataram a associação do patógeno a manchas foliares em *Mimosa caesalpiniaefolia* (sabiá) e SALES et al. (2009) encontraram o mesmo associado à mancha-foliar em *Yucca elephantipes* (yuca-gigante). *Colletotrichum gloeosporioides* já foi relatado como agente causal de mancha-foliar em *Camellia japonica* em Portugal (VAZQUEZ, 2002), e COPES e THOMSON (2008) afirmaram que este fungo também é agente causal do cancro de várias espécies do gênero *Camellia*, no sul dos Estados Unidos.

Diante do exposto, este trabalho apresenta o primeiro relato de *Colletotrichum gloeosporioides* em *Camellia japonica* no Rio Grande do Sul.

## REFERÊNCIAS

ALEXANDRE M. A. V. et al. Vírus, viróides, fitoplasmas e espiroplasmas detectados em plantas ornamentais no período de 1992 a 2003. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.11, n.1, p.49-57, 2005.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3.ed. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1972. 241p.

CARNAÚBA, J. P. et al. Ocorrência de *Colletotrichum gloeosporioides* em *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. no estado de Alagoas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.3, p.313, 2007. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-54052007000300021](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052007000300021)> Acesso em: 23 mai. 2012.

COPEL, W.E.; THOMSON, J.L. Survival analysis to determine the length of the incubation period of *Camellia* twig blight caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 92, n. 8, p.1177-1182, 2008. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS-92-8-1177>> Acesso em: 23 mai. 2012.

LINS, S.R.O.; COELHO, R.S.B. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.3, p.332-335, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/fb/v29n3/20374.pdf>> Acesso em: 22 mai. 2012.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. de. **Plantas Ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 4. Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 1088p.

MATHUR, R.S.; BARNETT, H.L.; LILLY, V.G. Sporulation of *Colletotrichum lindemuthianum* in culture. **Phytopathology**, v.40, p.104- 11, 1950.

PINHEIRO, M.R.R. **Estudo de variabilidade genética de *Aspergillus flavus* com base para o desenvolvimento de PCR multiplex para detecção de fungos produtores de aflatoxinas em castanha-do-brasil e castanha-de-caju**. 2004. 149p. (Dissertação Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) – Universidade Católica de Brasília, DF. 2004.

SALES, T.T. et al. Patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* e fungos associados a mancha foliar de *Yuca elephantipes*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, 34 (Suplemento): 194. 2009.

SERRA, IMRS; COELHO, R.S.B; MENEZES, M. Caracterização fisiológica, patogênica e análise isoenzimática de isolados monospóricos e multispóricos de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.34, n.2, p.113-120, 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-54052008000200001&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-54052008000200001&script=sci_arttext)> Acesso em: 23 mai. 2012.

VÁZQUEZ, J.P.M et al. Situação fitopatológica das camélias na região do Entre Douro e Minho de Portugal. **Boletín Sanidad Vegetal Plagas**, s. 1., v.28, p.609-622, 2002. Disponível em: <[http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf\\_plagas%2FBSVP-28-04-609-622.pdf](http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_plagas%2FBSVP-28-04-609-622.pdf)> Acesso em: 22 mai. 2012.

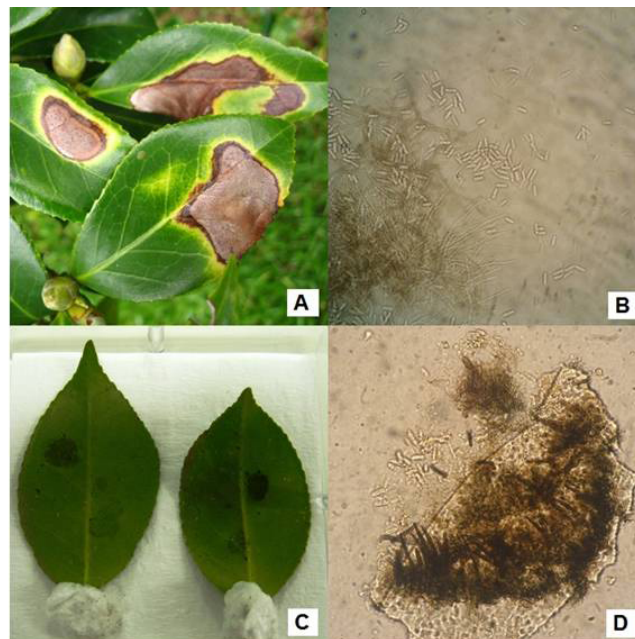


Figura 1. Mancha-foliar causada por *Colletotrichum gloeosporioides* em *Camellia japonica*. Sintomas observados em plantas no campus da UFSM (A); Formação de acérvulos e conídios vistos em microscópio com aumento 40 x (B); Sintomas em folhas inoculadas (C); Setas do patógeno vistas em microscópio com aumento 40 x (D)

Figure 1. Leaf spot caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in *Camellia japonica*. Symptoms observed on plants at the campus of UFSM (A); Formation acervula and conidia viewed under a microscope with an increase of 40 x (B); Symptoms in inoculated leaves (C); Arrows of the pathogen seen in microscope with increased of 40 x (D)