

DIFERENCIAÇÃO DE *VERTICILLIUM DAHLIAE* E *V. ALBO-ATRUM* POR CÍRCULO DE HOSPEDEIROS

C.C. Aparecido¹, E.C. Rosa², D. Finatti³

Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-900, São Paulo, SP, Brasil. ¹Pesquisador Científico. ²Agente de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica. ³Bolsista CNPq/PIBIC/IB. E-mail: christianeceriani@biologico.sp.gov.br.

RESUMO

O gênero *Verticillium* apresenta duas espécies importantes sob o ponto de vista fitopatogênico: *V. dahliae* e *V. albo-atrum*, cuja diferenciação pelas características morfológicas é bastante complicada devido à similaridade. Assim, com o objetivo de diferenciar culturas armazenadas na coleção Micoteca “Mário Barreto Figueiredo”, foi realizado o presente estudo. Inicialmente, foram realizados testes de viabilidade das culturas de *V. dahliae* (MMBF 247, MMBF 669 e MMBF 829 - isolados de plantas de berinjela, MMBF 668 - tomate, MMBF 752 - amendoim, MMBF 02/01 - quiabo e MMBF 09/01 - jiló) e *V. albo-atrum* (MMBF 7/75 - batata), por meio da transferência dos fragmentos armazenados para os meios de cultura ágar batata dextrose (BDA) e ágar-água (AA). Ocorrendo o crescimento da cultura, foram realizadas inoculações experimentais para os testes de patogenicidade no hospedeiro do original. Confirmada a manutenção da patogenicidade, os isolados foram inoculados em diferentes hospedeiros dos originais, sendo que essas inoculações cruzadas possibilitaram constatar que as plantas de quiabo foram mais suscetíveis a isolados obtidos de diferentes hospedeiros, enquanto que as plantas de amendoim, tomate e berinjela foram as mais resistentes, sendo infectadas somente pelo isolado original. Com relação a MMBF 7/75 - *V. albo-atrum*, essa cultura foi capaz de causar infecção e sintomas de murcha em plantas de batata, hospedeiro original, mas também nas plantas de pepino, utilizadas para a diferenciação das espécies *V. dahliae* e *V. albo-atrum*, comprovando a identificação dessa cultura.

PALAVRAS-CHAVE: preservação em laboratório, fungos, viabilidade, patogenicidade, inoculações cruzadas.

ABSTRACT

DIFFERENTIATION OF *VERTICILLIUM DAHLIAE* AND *V. ALBO-ATRUM* BY CIRCLE OF HOSTS

The genus *Verticillium* presents two important phytopathogenic species: *V. dahliae* and *V. albo-atrum*, whose differentiation by the morphological characteristics is quite complicated due to the similarity. Thus, in order to differentiate cultures stored in the Micoteca "Mário Barreto Figueiredo" collection, the present study was carried out. Initially, viability tests were carried out on the cultures of *V. dahliae* (MMBF 247, IB669 and MMBF 829 - isolated from eggplant, MMBF 668 - isolated from tomato plants, MMBF 752 - isolated from peanut plants, MMBF 02/01 - isolated from okra plants and MMBF 09/01 isolated from jiló plants) and *V. albo-atrum* (MMBF 7/75 - isolated from potato plants), by transferring the stored fragments to BDA and AA culture medium. Occurring the growth of the culture experimental inoculations were carried out for pathogenicity tests in the host of the original. Once the pathogenicity was maintained, the isolates were inoculated in different hosts of the originals, and these cross inoculations made it possible to verify that the okra plants were more susceptible to the isolates obtained from different hosts, whereas the peanut, tomato and eggplant plants were the less susceptible, being infected only by the original isolate. With respect to MMBF 7/75 - *V. albo-atrum*, it was able to cause infection and wilt symptoms in potato plants, original host, but also in cucumber plants, used for the differentiation of species *V. dahliae* and *V. albo-atrum*, proving the identification of MMBF 7/75, and also in cucumber plants, hosts used for *V. dahliae* and *V. albo-atrum* differentiation.

KEYWORDS: laboratory preservation, fungi, viability, pathogenicity, cross inoculations.

Com a expansão da agricultura e o cultivo de grandes áreas, os problemas causados por fitopatógenos também têm aumentado. Inúmeros patógenos podem causar prejuízos à agricultura, tanto devido à diminuição da produção, como também devido aos gastos com produtos químicos para a prevenção e o controle das doenças.

Dentre os diversos grupos fúngicos que podem causar problemas encontra-se o gênero *Verticillium*, que agrupa várias espécies. Sob o ponto de vista

fitopatogênico, apresentam importância: *V. dahliae* e *V. albo-atrum*. Esses patógenos são altamente polívoros, pois infectam ampla gama de plantas hospedeiras (NAIK et al., 2008; SILVA, 2017), afetando os vasos condutores, o que resulta em murcha, escurecimento de vasos, amarelecimento, subdesenvolvimento e, muitas vezes, morte repentina da planta (PAVAN et. al., 2016). Esses patógenos de solo apresentam ampla distribuição geográfica, sendo capazes de parasitar culturas economicamente importantes

como plantas ornamentais, olerícolas e frutíferas (BHAT; SUBBARAO, 1999), podendo ser fator limitante à produção. Penetram na planta diretamente pelas raízes, por meio de ferimentos ou, ainda, por meio dos pelos absorventes. Segundo vários autores, o círculo de plantas hospedeiras tem aumentado e, no que se refere à patogenicidade, existe variação do patógeno frente aos diferentes hospedeiros (BHAT; SUBBARAO, 1999; COUTINHO et al., 2001; PASSADOR et al., 2001; PASSADOR et al., 2002; REIS; SILVA BOITEUX, 2006). Em condições de campo, tais fungos podem se manter no solo indefinidamente, devido à ampla gama de hospedeiras, como solanáceas, outras famílias de plantas cultivadas e plantas daninhas (KUROZAWA et al., 2005).

A diferenciação das espécies citadas, em geral, tem sido realizada por meio de observações microscópicas para constatar a existência de microescleródios ou microesclerócios, formados somente por *V. dahliae* (WATANABE, 2010; INDERBITZIN et al., 2011). Porém, existem isolados que, embora produzam, não evidenciam tais estruturas, o que torna

difícil essa diferenciação. Já foi comprovado que inoculações experimentais em plantas indicadoras, que apresentam sintomas somente ao serem infectadas por *V. albo-atrum*, pode ser uma maneira mais confiável para essa diferenciação (APARECIDO et al., 2002).

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo avaliar o comportamento patogênico de culturas pertencentes ao gênero *Verticillium* (*V. dahliae* e *V. albo-atrum*), inoculadas em diferentes plantas hospedeiras, de modo a verificar se há especificidade do isolado em relação ao hospedeiro e/ou diferença na suscetibilidade da planta hospedeira.

Para verificar a viabilidade, amostras dos isolados constantes na Tabela 1, preservadas pelo método de Castellani (água destilada) foram, assepticamente, transferidas para placas contendo meio de cultura batata dextrose ágar (BDA). Para avaliação foram observados: o crescimento das culturas e as características morfológicas (coloração, presença ou não de microesclerócios, conidióforos e conídios) das amostras preservadas por cada método.

Tabela 1 - Culturas pertencentes ao gênero *Verticillium* utilizadas para a realização dos experimentos

Cultura	Espécie	Hospedeiro
MMBF 669	<i>V. dahliae</i>	berinjela
MMBF 752	<i>V. dahliae</i>	amendoim var. tatu
MMBF 829	<i>V. dahliae</i>	berinjela
MMBF 7/75	<i>V. albo-atrum</i>	batata
MMBF 02/01	<i>V. dahliae</i>	quiabo
MMBF 09/01	<i>V. dahliae</i>	jiló

Havendo crescimento das amostras e, assim que todo o diâmetro das placas foi tomado, foram realizadas as inoculações nos hospedeiros originais objetivando, também, comparar a eficiência dos métodos de Castellani (água destilada) quanto à preservação em laboratório. Para tanto, uma placa de cada amostra foi, separadamente, homogeneizada em liquidificador com 200 mL de água destilada. A cada vaso, com capacidade para 5 litros de solo estéril, contendo uma planta do hospedeiro original, com cerca de 10 cm de altura e 2 pares de folhas, 20 mL da suspensão obtida, contendo conídios, micélio e microescleródios (quando presentes), foram incorporados ao solo, que foi revolvido para que as raízes das plantas fossem brandamente feridas. Ao tratamento controle foram incorporados 20 mL de uma suspensão preparada com meio BDA triturado em liquidificador com água destilada e as raízes foram igualmente feridas. A avaliação foi realizada por meio de comparações, levando-se em consideração o aparecimento ou não

de sintomas nos hospedeiros inoculados e o tempo passado desde as inoculações até o início do aparecimento dos sintomas e a agressividade do patógeno. Sendo observados os sintomas característicos da doença (murcha, amarelimento), foi realizado reisolamento do patógeno. Todas as plantas foram mantidas em casa de vegetação, em temperatura ambiente ($25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$) e com irrigação automática, duas vezes ao dia, durante 3 minutos. Para cada tratamento havia 4 (quatro) repetições.

Cada um dos isolados ainda patogênicos selecionados por meio do teste de patogenicidade, foi inoculado em todos os hospedeiros disponíveis, a saber: quiabeiro [*Abelmoschus esculentus* (L) Moench], berinjela (*Solanum melongena* L.), pepino (*Cucumis sativus*), amendoim (*Arachis hypogaea* L.), batata (*Solanum tuberosum*) e jiló (*Solanum gilo*). Para tanto, duas placas de cada cultura foram utilizadas e preparadas conforme descrito no item 2. Para as avaliações foi observado o aparecimento de sintomas, reg-

istrando-se, também, o número de dias após as inoculações (dai) em que tais sintomas surgiram. Sendo observados os sintomas característicos da doença, foi realizado reisolamento do patógeno. Todas as culturas utilizadas nesse estudo e mantidas pelo método de Castellani estavam viáveis, pois apresentaram crescimento sobre os meios de cultura (BDA e AA) utilizados. As observações macroscópicas possibilitaram constatar que todas as culturas do gênero apresentavam micélio branco, sendo que algumas da espécie *V. dahliae* apre-

sentavam reverso negro, devido à produção de microescleródios, enquanto em outras, assim como a cultura MMBF 7/75 (*V. albo-atrum*), o reverso era branco. As observações microscópicas possibilitaram identificar em todas as culturas ramificações verticiladas, formando, no geral, 3 (três) conidióforos eretos, septados e ramificados, ligados por um eixo principal, em cujas extremidades são formados conídios unicelulares hialinos, conforme descrito em literatura por WATANABE (2010). A Figura 1 ilustra os resultados descritos.

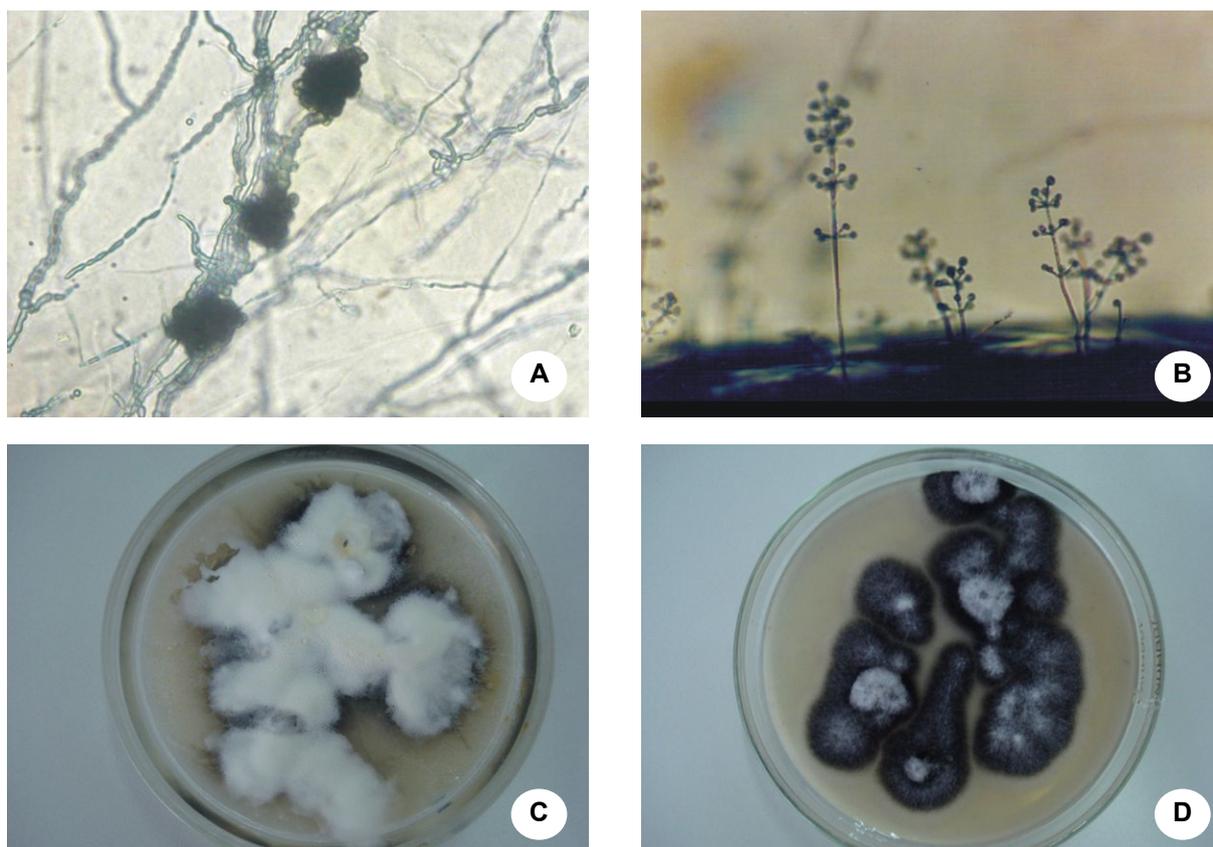


Figura 1 - Características microscópicas (A → Microescleródios. B → Conidióforos verticilados) e macroscópicas (C e D) de *Verticillium*.

No que se refere às inoculações, todas as plantas inoculadas com amostras mantidas pelo método de Castellani (água destilada) apresentaram amarellecimento e flacidez das folhas, além de acentuada necrose da margem de um dos lados do limbo foliar e subdesen-

volvimento das plantas inoculadas. Estes resultados demonstram a eficiência do método, conforme já constatado por RUSOMANNO et al. (1995). Os sintomas foram observados de 10 a 13 dias após as inoculações (Figura 2).

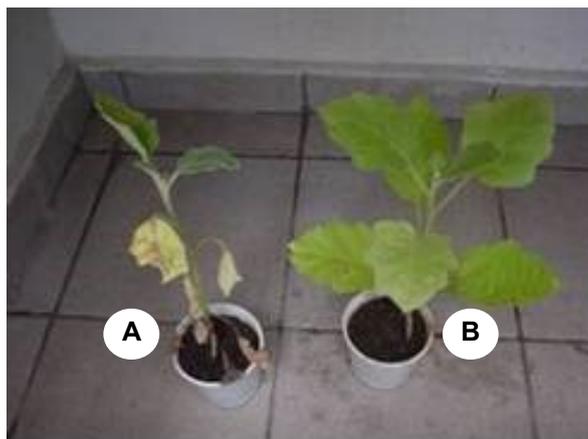


Figura 2 - Inoculação de *Verticillium dahliae* (IB829) em plantas de berinjela. A → Amostra mantida pelo método de Castellani. B → Tratamento controle.

A partir dos resultados obtidos, pôde-se verificar que as plantas de quiabo demonstraram maior suscetibilidade aos diferentes isolados do gênero *Verticillium*, principalmente aqueles provenientes de plantas de berinjela, visto que foram

observados os sintomas característicos de subdesenvolvimento, murcha e morte das plantas entre 10 e 20 dias após as inoculações. A Figura 3 ilustra o resultado observado.

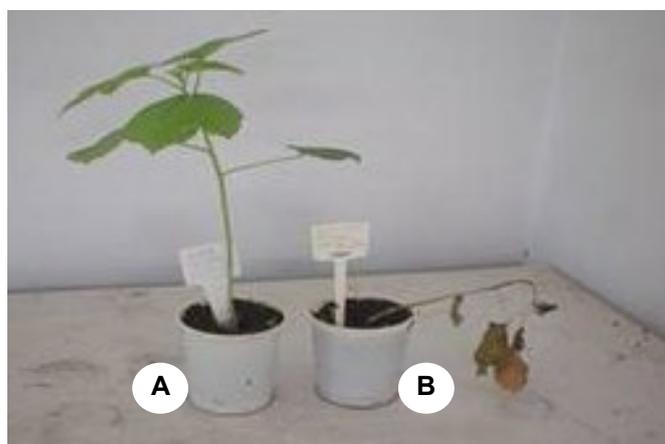


Figura 3 - *Verticillium dahliae* isolado de berinjela e inoculado em quiabo. A → Tratamento controle. B → Planta inoculada com MMBF 247.

Levando-se em consideração o hospedeiro, as plantas de amendoim e batata mostraram-se as menos suscetíveis, sendo infectadas somente pela cultura isolada da mesma planta hospedeira. Com relação às plantas de berinjela, estas foram infectadas somente por isolados de berinjela (MMBF 247, MMBF 669 e MMBF 829). Porém, esses mesmos isolados foram capazes de infectar plantas de quiabo (MMBF 247 e MMBF 669) e jiló (MMBF 829). Dentre esses isolados, MMBF 829 foi o que demonstrou ser menos específico, já que pôde infectar maior número de hospedeiros, dentre os inoculados. Os isolados MMBF 668, MMBF 752 e MMBF 02/01 mostraram-se os mais específicos, pois infectaram somente os hospedeiros originais, ou seja, plantas de tomate, amendoim e quiabo. Todas as culturas foram inoculadas em pepino, porém somente o isolado MMBF 7/75, identificado como *Verticillium albo-atrum* foi capaz de induzir sintomas

de murcha, conforme já era o esperado. Isto porque o pepino é uma planta diferenciadora, infectada somente por *V. albo-atrum*, o que comprovou a identificação taxonômica do isolado MMBF 7/75 e possibilitou classificar os demais isolados como *V. dahliae*. Plantas de alfafa desempenham o mesmo papel para a diferenciação das duas espécies fúngicas. Porém, neste estudo, foram utilizadas plantas de pepino devido à facilidade em se obter sementes e produzir os hospedeiros. Na Tabela 2 estão registrados os resultados obtidos. Deve-se informar que a cultura MMBF 668 isolada de tomateiro foi patogênica somente ao seu hospedeiro original. Observa-se, portanto, que nas inoculações cruzadas o hospedeiro mais suscetível foi o quiabo, enquanto que as plantas de amendoim, batata e berinjela mostraram-se os hospedeiros menos suscetíveis, sendo infectados somente pelo isolado original.

Tabela 2 - Resultados observados das inoculações cruzadas

Hospedeiro	Nº da cultura							
	MMBF 247	MMBF 668	MMBF 669	MMBF 752	MMBF 829	MMBF 7/75	MMBF 02/01	MMBF 09/01
Berinjela	+	-	+	-	+	-	-	-
Amendoim	-	-	-	+	-	-	-	-
Batata	-	-	-	-	-	+	-	-
Quiabo	+	-	+	-	+	-	+	+
Jiló	-	-	-	-	+	-	-	+
Pepino	-	-	-	-	-	+	-	-

(+) observação de sintomas; (-) sem aparecimento de sintomas.

BHAT; SUBBARAO (1999) constataram especificidade ao hospedeiro de ambas as espécies estudadas: no que se refere a *V. dahliae*, a especificidade foi reconhecida em isolados obtidos de berinjela, tomate, pimenta e crucíferas. No presente estudo, a especificidade também foi reconhecida em isolados obtidos a partir de plantas de tomate (MMBF 668), amendoim (MMBF 752) e quiabo (MMBF 02/01). Com relação a *V. albo-atrum*, BHAT; SUBBARAO (1999) constataram patogenicidade somente quando os isolados foram inoculados sobre o hospedeiro original. Neste estudo,

MMBF 7/75 (*V. albo-atrum*) foi patogênico às plantas de batata, hospedeiro do qual foi originalmente isolado e às plantas de pepino, confirmando o potencial diferenciador entre as espécies *V. dahliae* e *V. albo-atrum* desse hospedeiro.

Assim, o estudo permitiu concluir que as culturas registradas na Coleção, como MMBF 247, IB668, MMBF 752, MMBF 829, MMBF 02/01 e MMBF 09/01 pertencem à espécie *V. dahliae* devido à grande quantidade de microesclerócios observados e, também, por não terem apresentado sintomas quando inoculadas em plantas de pepino.

REFERÊNCIAS

- APARECIDO, C.C.; COUTINHO, L.N.; FIGUEIREDO, M.B. Diferenciação de *Verticillium dahliae* e *V. albo-atrum*. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.69, p.67, Suplemento, 2002.
- BHAT, R.G.; SUBBARAO, K.V. Host range specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, v.89, p.1218-1225, 1999.
- COUTINHO, L.N.; APARECIDO, C.C.; FIGUEIREDO, M.B. *Craspedia* sp. – novo hospedeiro de *Verticillium dahliae*. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.68, p.3, Suplemento, 2001.
- INDERBITZIN, P.; SUBBARAO K.V. *Verticillium* systematics and evolution: how confusion impedes verticillium wilt management and how to resolve it. *Phytopathology*, v.104, n.6, p.564-574. 2014.
- PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R.; MOURA, M.F.; KUROZAWA, C. 2016. *Doenças das Solanáceas*. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMINI FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. Manual de Fitopatologia. Doenças de Plantas Cultivadas. 5ed. Viçosa, MG: Agronômica Ceres. p. 677-687 V.2
- NAIK, M.K.; RANI, G.S.D.; PRASADI, R.D.; PATIL, M.B.; SEN, B. *An overview of soil borne plant pathogens*. In: Advances in soil borne plant diseases. New Delhi: New India Publishing Agency, 2008. p.1-33.
- PASSADOR, M.M.; APARECIDO, C.C.; FIGUEIREDO, M.B. Isolamento de *Verticillium dahliae* e sua inoculação em três hospedeiros distintos. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.68, p.74, Suplemento, 2001.
- PASSADOR, M.M.; APARECIDO, C.C.; FIGUEIREDO, M.B. Isolamento de *Verticillium dahliae* e sua inoculação em dois hospedeiros distintos. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.69, p.214-215, Suplemento, 2002.
- REIS, A.; SILVA BOITEUX, L. Círculo de hospedeiras de isolados de *Verticillium dahliae* obtidos de tomateiro, quiabeiro, e morangueiro. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, Brasília: 2006. v.21, 16p.
- RUSSOMANNO, O.M.R.; COUTINHO, L.N.; FIGUEIREDO, M.B.; PIMENTEL, C.P.V. Preservação da patogenicidade de culturas de *Verticillium dahliae* conservadas em água destilada. *Summa Phytopathologica*, v.21, p.178-181, 1995.
- SILVA, T.W.R. Ocorrência, identificação e manejo da raça 2 de *Verticillium dahliae* em tomateiro. *Artigos Técnicos*, 2017. In: <https://www.seminis.com.br/ocorrencia-identificacao-e-manejo-da-raca-2-de-verticillium-dahliae-em-tomateiro>. Acessado em: 24 de mai. 2019.
- WATANABE, T. *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi*: Morphologies and cultured fungi and key to species. In: Boca Raton: CRC Press, 2010. 426p.

Recebido: 30/05/2019

Aprovado: 02/07/2019