

**UTILIZAÇÃO DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
VARREDURA NA OBSERVAÇÃO DA INFECÇÃO PELO FUNGO
COLLETOTRICHUM GLOESPORIOIDES NA CASCA DE
GOIABAS CV PALUMA**

**USE OF SCANNING ELECTRON MICROSCOPY IN OBSERVING
INFECTION BY THE FUNGUS *COLLETOTRICHUM
GLOESPORIOIDES* IN THE SKIN OF PALUMA GUAVAS**

CRISTIANE MARIA ASCARI MORGADO

UEG - Universidade Estadual de Goiás, Anápolis / GO
cristiane.morgado@ueg.br

LEONARDO GOMES COSTA

UEG - Universidade Estadual de Goiás, Anápolis / GO
leonardo.costa@aluno.ueg.br

ANIELLY MONTEIRO DE MELO

UEG - Universidade Estadual de Goiás, Anápolis / GO
anielly@aluno.ueg.br

MARIA FERNANDA BERLINGIERI DURIGAN

Embrapa Instrumentação, São Carlos / SP
maria.durigan@embrapa.br

ANDRÉ JOSÉ DE CAMPOS

UEG - Universidade Estadual de Goiás, Anápolis / GO
andre.jose@ueg.br

Resumo: A antracnose, causada por espécies de *Colletotrichum*, é a principal doença de frutos em pós-colheita, que é caracterizada pelo aparecimento de manchas pretas, marrom ou cinza, além de podridão e perda da qualidade devido a mudança de aparência do fruto. O uso da microscopia eletrônica de varredura permite a observação da estrutura celular, possibilitando também a visualização da penetração desta doença nos frutos. O objetivo deste trabalho foi verificar como ocorre a penetração do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* inoculados na casca de goiabas cv Paluma. Fragmentos de casca foram cortados com uma lâmina de bisturi e colocados em uma placa de Petri com algodão umedecido. Em cada fragmento, inoculou-se o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* com auxílio de um pincel. Em seguida, foram mantidos à temperatura de 25 °C para desenvolvimento das lesões de antracnose. Essas amostras foram coletadas em 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 e 105 horas após a inoculação e também 10 dias da inoculação e em seguida procedeu-se à verificação das estruturas celulares e da penetração do fungo através da microscopia eletrônica de varredura. A microscopia eletrônica de varredura é uma ferramenta eficaz no acompanhamento da contaminação por antracnose, visto que permitiu verificar o comportamento do fungo desde o momento da inoculação até a sua penetração completa na casca de goiabas cv Paluma, podendo causar possíveis danos celulares aos frutos, e consequentemente comprometendo sua qualidade comercial.

Palavras-chave: Inoculação. Antracnose. *Psidium guajava*.

Revista Mirante, Anápolis (GO), v. 17, n. 1, p. 195-202, jun. 2024. ISSN 1981-4089

Abstract: Anthracnose, caused by species of *Colletotrichum*, is the main post-harvest fruit disease, characterized by the appearance of black, brown, or gray spots, as well as rot and loss of quality due to changes in the fruit's appearance. The use of scanning electron microscopy allows for the observation of cellular structure, enabling the visualization of the penetration of this disease into fruits. The objective of this study was to investigate how the penetration of the fungus *Colletotrichum gloeosporioides* occurs when inoculated into the skin of Paluma guavas. Skin fragments were cut with a scalpel blade and placed on a Petri dish with moistened cotton. The fungus *Colletotrichum gloeosporioides* was inoculated onto each fragment using a brush. Subsequently, the samples were kept at a temperature of 25 °C to allow for the development of anthracnose lesions. These samples were collected at 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, and 105 hours after inoculation, as well as 10 days after inoculation. The cellular structures and the fungus penetration were then examined using scanning electron microscopy. Scanning electron microscopy is an effective tool for monitoring anthracnose contamination, as it has allowed the observation of the fungus's behavior from the moment of inoculation until its complete penetration into the skin of Paluma guavas. This penetration can potentially cause cellular damage to the fruits, thereby compromising their commercial quality.

Keywords: Inoculation, Anthracnose, *Psidium guajava*.

Introdução

A goiaba (*Psidium guajava* L.), pertencente à família Myrtaceae, é originária da região tropical do continente americano, com provável centro de origem na região compreendida entre o sul do México e o norte da América do Sul. Encontra-se amplamente difundida por todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo. No Brasil, é cultivada desde o Rio Grande do Sul até o Maranhão, destacando-se o Estado de São Paulo como maior produtor (JAMIESON *et al.*, 2021).

A produção de frutas com qualidade, objetivando a comercialização das mesmas como produtos frescos, em mercados cada vez mais exigentes, tem sido a tônica da fruticultura brasileira (LANZ; NACHTIGAL, 2019). Sabendo-se desses parâmetros de qualidade, as doenças de plantas são responsáveis por grandes perdas nas culturas de importância econômica, dentre as quais se destacam as doenças pós-colheita em frutíferas (SILVA, 2022).

Dentre as moléstias responsáveis por essas perdas na agricultura, existem os fungos do gênero *Colletotrichum* que são fitopatógenos importantes. Os fungos desse gênero são os causadores de uma diversidade de doenças, como antracnose, podridão do pedúnculo, varicela em manga, abacate e mamão (ROBERTA; MORAES; MENINI, 2022).

A antracnose é a principal doença de frutos em pós-colheita (CASEMIRO *et al.*, 2019), sendo que o sintoma típico é caracterizado por lesões arredondadas, grandes, necróticas, com o centro dos tecidos deprimidos, onde são produzidas massas de

Revista Mirante, Anápolis (GO), v. 17, n. 1, p. 195-202, jun. 2024. ISSN 1981-4089
conídios de coloração alaranjada, podendo ocorrer uma podridão-mole nos frutos, prejudicando a sua comercialização (ARAUJO *et al.*, 2021).

Assim, o uso de ferramentas para monitorar os danos causados por esta doença é muito importante. Entre elas, tem-se a utilização do microscópio eletrônico e a melhoria das técnicas de preparação das amostras que ampliaram, sobremaneira, a capacidade de observação da ultraestrutura celular. Muitas concepções sobre a morfologia de certos organismos sobre a organização de tecidos e funções celulares foram radicalmente alteradas. Nenhuma outra ferramenta de pesquisa mostrou tão rápido avanço quanto os microscópios eletrônicos de transmissão e de varredura (JUHÁSZ *et al.*, 2021).

A microscopia eletrônica de Varredura (MEV), quando comparada com outras técnicas como por exemplo a microscopia óptica, apresenta custo elevado, entretanto, a principal vantagem é em relação à resolução das imagens, visto que a MEV possui uma resolução de até 0,1 nanômetro, que é superior a microscopia óptica. Essa resolução permite observar detalhes como por exemplo a observação de microrganismo (HENRIQUES, 2019).

O conhecimento do processo de infecção das espécies de *Colletotrichum*, assim como dos fatores que influenciam tais processos, é de extrema importância para se elucidarem questões, tais como a adesão de conídios, relação com a topografia do hospedeiro, tipo de penetração e a formação de apressório. Além disso, é considerado um pré-requisito para o desenvolvimento de estratégias de controle. O processo de infecção no gênero *Colletotrichum* é composto por uma sequência comum de eventos: adesão do conídio, germinação, alongação do tubo germinativo, formação do apressório, desenvolvimento de peg de infecção, penetração de células epidérmicas, crescimento das hifas intracelularmente, necrose celular e desenvolvimento de lesões (SOUZA *et al.*, 2023).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo verificar como ocorre a penetração do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* inoculados na casca de goiabas cv Paluma.

Material e métodos

As goiabas cv Paluma utilizadas neste experimento foram colhidas no estágio de maturidade fisiológica, ou seja, quando a casca apresenta coloração verde-amarelada.

Neste estágio, os frutos apresentam valores médios de sólidos solúveis, acidez titulável e pH de 8,9 °Brix, 0,70% de ácido cítrico e 3,8 de pH, respectivamente (MORGADO *et al.*, 2012). Um isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* foi utilizado como fonte de inóculo para o experimento. A patogenicidade do isolado foi verificada pela inoculação do fruto de goiaba.

Fragmentos da casca de goiabas cv Paluma, medindo 1x1x0,5cm (comprimento x largura x altura), foram cortados com auxílio de uma lâmina de bisturi e colocados em uma placa de Petri com algodão umedecido. Em cada fragmento, inoculou-se o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* com auxílio de um pincel. Em seguida, foram mantidos à temperatura de 25 °C para desenvolvimento das lesões de antracnose. Essas amostras foram coletadas em 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 e 105 horas após a inoculação.

Além dessas amostras, coletou-se uma após 10 dias da inoculação. À medida que as amostras foram sendo coletadas eram imediatamente fixadas em glutaraldeído a 3%, em tampão de fosfato de potássio a 0,05 mol L⁻¹ e pH 7,4, por 72 h. A seguir, foram lavadas com solução tampão pura, e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 2%, no mesmo tampão, por aproximadamente 12 h. Posteriormente, foram novamente lavadas com a solução tampão, desidratadas em uma série gradual de álcool etílico (30; 50; 70; 80; 90; 95; 100; 100 e 100%), durante 20 minutos em cada solução, secas em secador de ponto crítico, utilizando-se de CO₂, montadas, metalizadas com cerca de 35 nm de ouro-paládio, observadas e eletromicrografadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 5410, operado em 15 kV (SANTOS & MAIA, 1997).

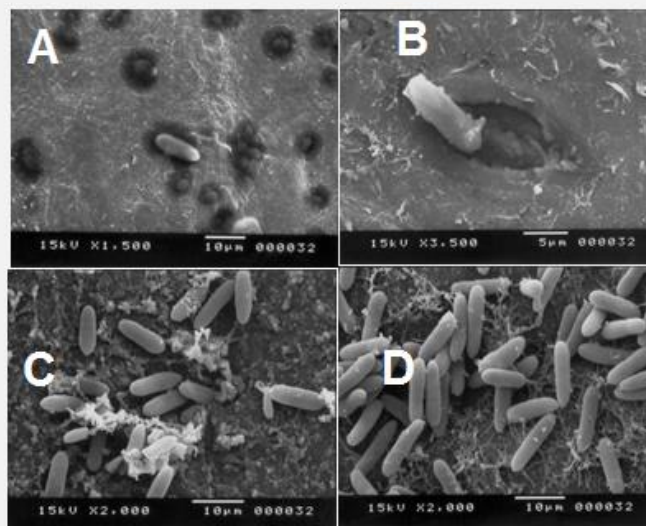
Os resultados obtidos foram analisados através das eletromicrografias de varredura da estrutura do tecido da casca de goiabas cv. Paluma inoculadas com o *Colletotrichum* obtidas no momento da inoculação (0h) e após 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 105 h e 10 dias da inoculação.

Resultados e discussão

Com base nos resultados obtidos, constatou-se que as micrografias das superfícies feridas inoculadas revelaram a presença de fungos com formato de bastonete. Notou-se que, após 3 horas da inoculação, o fungo iniciou a penetração na casca (Figura 1B). Mesmo após 72 horas (Figura 2D), o fungo continuava a penetrar na casca. Na marca das 105 horas (Figuras 3A e 3B), ocorreu a formação de uma massa de

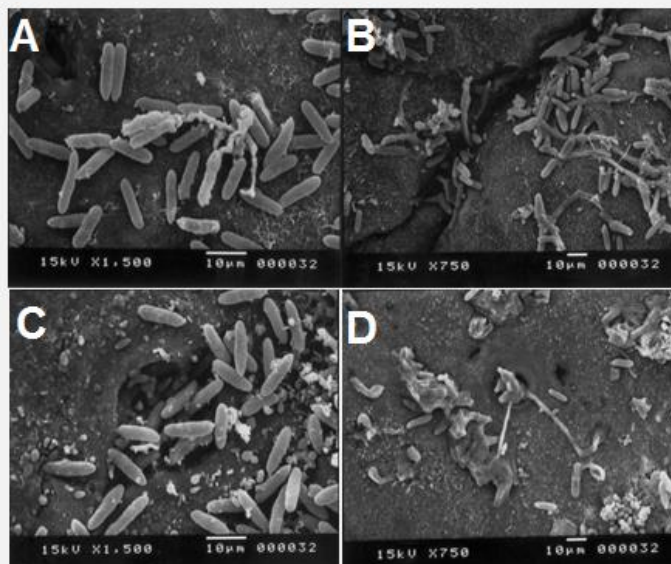
Revista Mirante, Anápolis (GO), v. 17, n. 1, p. 195-202, jun. 2024. ISSN 1981-4089 fungos na parte externa da casca, indicando uma penetração completa, confirmada pela presença no lado inferior da casca. Após 10 dias (Figuras 3C e 3D), observaram-se danos severos nos frutos de goiaba cv. Paluma causados por este fungo.

Figura 1. Micrografias eletrônicas de varredura da casca de goiabas cv. Paluma inoculadas com *C. gloeosporioides*. A) Superfície da casca logo após a inoculação. B) Superfície da casca 3 horas após a inoculação. C) Superfície da casca 6 horas após a inoculação. D) Superfície da casca 9 horas após a inoculação.



Fontes: Autores.

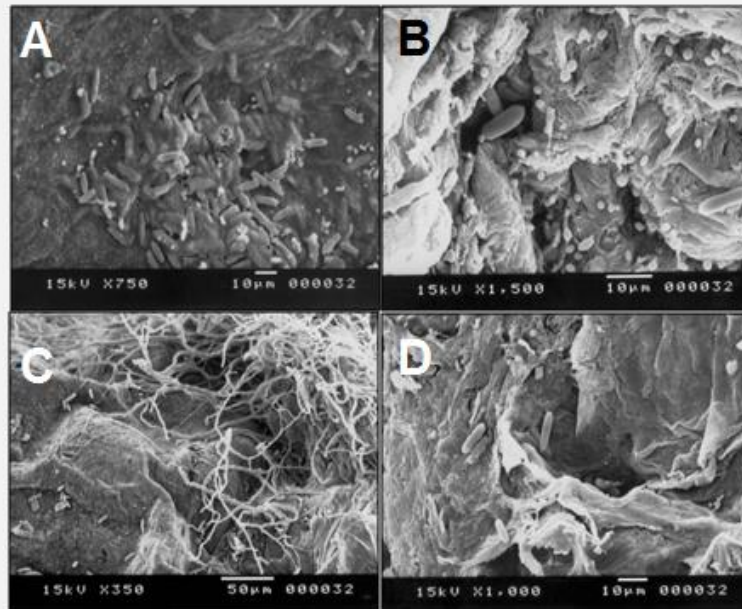
Figura 2. Micrografias eletrônicas de varredura da casca de goiabas cv. Paluma inoculadas com *C. gloeosporioides*. A) Superfície da casca após 12 horas da inoculação. B) Superfície da casca 24 horas após a inoculação. C) Superfície da casca 48 horas após a inoculação. D) Superfície da casca 72 horas após a inoculação.



Fonte: Autores.

Revista Mirante, Anápolis (GO), v. 17, n. 1, p. 195-202, jun. 2024. ISSN 1981-4089

Figura 3. Micrografias eletrônicas de varredura da casca de goiabas cv. Paluma inoculadas com *C. gloeosporioides*. A) Superfície externa da casca após 105 horas da inoculação. B) Superfície interna da casca 105 horas após a inoculação. C) Superfície externa da casca 10 dias após a inoculação. D) Superfície interna da casca 10 dias após a inoculação.



Fonte: Autores.

Como se sabe, a goiaba cv. Paluma é um espécime que é mais utilizada no processo de industrialização, pois o fruto possui características físicas e químicas que propiciam a industrialização, e conseqüente agregação de valor, como a elaboração de sucos, compotas, doce em pasta e polpas. Além da apreciação industrial, a goiaba cv. Paluma tem a vantagem de ser um fruto de cultura mista, ou seja, pode ser consumida fresca (SIMÕES *et al.*, 2023).

Em relação ao fungo *Colletorichum gloeosporioides*, ele pode gerar doenças como a antracnose, a qual ocasiona o aparecimento de manchas pretas, marrom ou cinzas, além de podridão e perda da qualidade devido a mudança de aparência do fruto (LI *et al.*, 2023).

Dessa forma, elucidar a microestrutura da pele do fruto, durante o ataque do fungo, através de varredura microscópica inicial é de extrema importância para a criação de ferramentas de defesas que possam proteger o fruto pós-colheita, aumentando-se a sua produção e seu potencial de mercado.

Através da microscopia eletrônica de varredura observou-se que o fungo *Colletotrichum* precisou de apenas de 105 horas após inoculação para mostrar danos severos no fruto goiaba cv Paluma, mostrando o prejuízo que este pode causar na lavoura e estocagem deste fruto. Esta informação poderá servir de subsídio para entomólogos, entidades de prevenção pós-colheita na elaboração de meios de prevenção biológica ou com defensivos agroecológicos.

Agradecimentos

Os autores gostariam de expressar profunda gratidão aos professores Jaime Maia dos Santos (UNESP/Jaboticabal) e José Fernando Durigan “in memoriam” (UNESP/Jaboticabal) por sua orientação e apoio constante durante a realização desta pesquisa, além de fornecerem apoio valioso e acesso aos laboratórios e equipamentos para o desenvolvimento do trabalho.

Referências

ARAUJO, B. L. M.; BEZ, F. S.; BUENO, T. R.; DRAWANZ, B. B.; ANTUNES, L. E. G.; BOCCHESI, C. A. C. Microrganismos associados a sintomas de doenças em frutíferas nativas de clima subtropical no noroeste do Rio Grande do Sul. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 16, n. 4, p. 413–420, 2021.

CASEMIRO, J. C. L.; BACCHI, L. M. A.; DOS REIS, H. F.; GAVASSONI, W. L. Chitosan associated with plant extracts in the post-harvest control of anthracnose in papaya ‘Formosa’. **Summa Phytopathologica**, v. 45, n. 1, p. 64–69, 2019.

HENRIQUES, R. L. **Utilização da microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliação da ação de cloretos em compósitos de matriz cimentícia**. Trabalho de Conclusão de Curso. Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais. 56 p. 2019.

JAMIESON, S.; WALLACE, C.E.; DAS, N.; BHATTACHARYYA, P.; BISHAYEE, A. Guava (*Psidium guajava* L.): a glorious plant with cancer preventive and therapeutic potential. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 63, n. 2, p. 192-223, 2021.

JUHÁSZ, L.; MOLDOVÁN, K.; GURIKOV, P.; LIEBNER, F.; FÁBIÁN, I.; KALMÁR, J.; CSERHÁTI, C. False morphology of aerogels caused by gold coating for sem imaging. **Polymers**, v. 13, n. 4, p. 1-12, 2021.

LANZ, C.; NACHTIGAL, L. Parâmetros de qualidade de polpas de uva e acerola congeladas. **Revista de Ciência e Inovação**, v. 4, n. 1, p. 94-105, 2019.

LI, Y.; SONG, X.; HE, K.; YU, J.; XU, M.; GUO, Z.; WANG, X.; ZHANG, X. First Report of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose on peanut in Chongqing, China. **Plant Disease**. Epub ahead of print, 2023.

MORGADO, C. M. A.; DURIGAN, J. F.; DURIGAN, M. F. B.; LOPES, V. G. Postharvest conservation of mature-green and ripe 'Paluma' guava stored at two temperatures. **Acta Horticulturae**, v. 934, p. 791-798, 2012.

ROBERTA, C.; MORAES, D. O.; MENINI, L. Métodos de manejo agroecológicos para o controle da antracnose (*Colletotrichum* spp.) em mamoeiro. **Vitória: Edifes Acadêmico**, p. 1-13, 2022.

SANTOS, J. M.; MAIA, A. S. A SEM technique for preparing biological control agents of nematodes in action. **Acta Microscopica**, Rio de Janeiro, v. 6, p. 550-551, 1997.

SILVA, A. F. C. Pest crops, pathogens, and plants in the history of agroecological systems. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi: **Ciências Humanas**, v. 17, n. 1, p. 1-32, 2022.

SIMÕES, W. L.; ANDRADE, V. P. M.; SILVA, J. S.; SANTOS, C. A. F.; SOUSA, J. S. C.; CALGARO, M.; BARBOSA, K. V. F.; NASCIMENTO, B. R. do. Fruit production and quality of 'Paluma' guava with nematode-tolerant rootstock irrigated in the semi-arid region. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 27, n. 5, p. 400–406, maio 2023.

SOUZA, T. M.; PEREIRA, J.; BEZERRA, J. L.; DE OLIVEIRA, R. J. V. First report of *Colletotrichum tropicale* causing leaf spot on *Cariniana legalis* in Brazil. **Plant Disease**, v. 107, n. 2, p. 578, 2023.