

Influência de meios de cultura sobre o crescimento, esporulação e peso seco de *Botrytis cinerea*

Domingos Eduardo G.T. ANDRADE¹; Regina Ceres Torres da ROSA¹; Tereza Cristina ASSIS²; Maria MENEZES³

RESUMO: O crescimento micelial, taxa de crescimento, peso seco e esporulação de *Botrytis cinerea* foram estudados em relação aos meios de cultura BDA, CDA, LDA e AA, sob condições de claro contínuo. Todos os meios de cultura estudados propiciaram um bom crescimento micelial, entretanto, o meio BDA apresentou a maior taxa de crescimento micelial, seguido dos meios CDA, LDA e AA, nesta ordem. Em relação a produção de conídios, os resultados demonstraram que a maior esporulação foi obtida em meio de cultura LDA, quando comparada aos demais meios testados e as menores em BDA e CDA. O maior peso seco foi observado em meio de cultura AA e o menor em LDA. Os resultados evidenciaram que os meios de cultura influenciaram significativamente na taxa de crescimento micelial, esporulação e peso seco de *B. cinerea*.

Palavras chave: *Botrytis cinerea*, meios de cultura, morangueiro, crescimento micelial, esporulação, peso seco, taxa de crescimento.

INTRODUÇÃO

O cultivo do morangueiro (*Fragaria* spp.) vem assumindo especial importância em Pernambuco, assim como as doenças que ocorrem nesta cultura, destacando-se o mofo cinzento, causado pelo fungo *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., pertencente à classe dos Deuteromycetes (Alexopoulos & Mims, 1979). O mofo cinzento ocasiona graves prejuízos em todas as regiões produtoras de morango do mundo, sendo o fungo *B. cinerea* comumente encontrado atacando frutos do morangueiro, no entanto, este pode atacar os bulbos florais, pétalas, pedúnculos dos frutos, folhas e pecíolos da planta (Maas, 1984).

A doença ocorre em quase todos os estádios de desenvolvimento da planta, sendo o uso de fungicidas, na maior parte dos casos, a única alternativa viável de controle (Maas, 1984). Entretanto, o controle químico vem se tornando um problema sério, devido ao desenvolvimento de resistência aos produtos utilizados (Cabrin & Kimati, 1986; Ghini, 1996) e ao efeito residual destes produtos sobre os frutos, exigindo com isso alternativas de controle para o manejo da doença (Peng & Sutton, 1991; Ghini & Vitti, 1993).

Como o desenvolvimento fúngico é influenciado por vários fatores nutricionais e ambientais, como fontes de nutrientes, relação carbono/nitrogênio, potencial solúvel do meio, luminosidade, umidade, aeração e pH (Cochrane, 1958), torna-se necessária a realização de estudos que visem a produção de propágulos de *B. cinerea* em meio de cultura, o que facilitaria sua utilização em pesquisas posteriores.

O presente trabalho teve por objetivos verificar a influência de diferentes meios de cultura no crescimento micelial, taxa de crescimento, esporulação e peso seco de *B. cinerea*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado um isolado de *B. cinerea* proveniente da Micoteca do Laboratório de Micologia da Área de Fitossanidade, do Departamento de Agronomia da UFRPE, obtido de frutos de morango com sintomas da doença.

Os meios de cultura utilizados como substratos para o crescimento de *B. cinerea* foram os seguintes: BDA (batata, 200g; dextrose, 20g; ágar, 17g; água destilada, 1.000mL), CDA (cenoura, 200g; dextrose, 20g; ágar, 17g; água destilada, 1.000mL), AA (flocos de aveia, 75g; ágar, 17g; água destilada, 1.000mL) e LDA (dextrose, 10g; ágar, 17g; potássio, 0,5g; sulfato de magnésio, 0,2g; cloreto de sódio, 0,1g; carbonato de cálcio, 3g; extrato de levedura a 10%, 100mL; água destilada, 900mL).

Da cultura pura de um isolado de *B. cinerea*, cultivado em BDA, sob alternância luminosa, durante três dias, removeu-se discos de micélio (4mm de diâmetro), os quais foram transferidos individualmente para o centro de placas de Petri, contendo 20mL, aproximadamente, dos diferentes meios testados. Em seguida, as placas foram incubadas à temperatura de 24±3°C e umidade relativa de 65±6%, mantidas em claro contínuo, seguindo-se o delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e três repetições.

O crescimento micelial foi determinado através da medição do diâmetro das colônias, em sentidos diametralmente opostos, com uma régua milimetrada, subtraindo-se os 4mm do disco de inóculo inicial. As avaliações foram diárias, sendo iniciadas 24 horas após a montagem do experimento, realizando-se as leituras até que quaisquer das repetições atingissem todo o diâmetro da placa, em qualquer meio de cultura. Os dados diários do crescimento micelial foram utilizados para elaborar as curvas de crescimento do fungo, sendo os dados do último dia da avaliação

¹Bolsista do CNPq

²Bolsista da CAPES

³Prof. Adjunto do Depto. de Agronomia da UFRPE

analisados estatisticamente. A taxa de crescimento expressa em mm/h, foi obtida entre o primeiro e o segundo dia de crescimento e avaliada conforme Lilly & Barnett (1951).

Após a avaliação do crescimento do fungo, procedeu-se a determinação da esporulação a partir do preparo de suspensões de conídios. As suspensões foram obtidas pela adição de 20mL de água destilada esterilizada a cada placa e remoção das estruturas da mesma, com o auxílio de uma escova de cerdas macias. Procedeu-se, em seguida, a filtragem em camada dupla de gaze, a fim de se obter suspensões de conídios isentas de meio de cultura e micélio do fungo. A determinação do número de conídios foi efetuada pela média das leituras obtidas em dois campos da câmara de Neubauer.

No estudo do peso seco de *B. cinerea*, discos de cultura contendo propagulos do fungo foram retirados do meio BDA e transferidos para Erlenmeyers de 125mL, contendo 50mL dos diferentes meios citados anteriormente, sem adição de ágar, com três repetições cada. A incubação foi feita a temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $60\pm 3\%$, em regime de claro contínuo. Após cinco dias de incubação, o micélio foi filtrado em tecido de nylon, sendo a massa micelial colocada em caixas de papel alumínio previamente secas e taradas. Em seguida, as caixas foram mantidas em estufa à 50°C por 24 horas e pesadas para a determinação do peso seco do fungo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos para o crescimento micelial e taxa de crescimento de *B. cinerea*, após 4 dias de incubação demonstraram variação apenas em relação a esta última variável (Tabela 1).

Tabela 1- Influência de meios de cultura sobre o crescimento micelial (mm) e taxa de crescimento (mm/h) de *B. cinerea*

Meios de Cultura	Crescimento micelial	Taxa de crescimento
BDA	83,16 a	1,23 a
CDA	81,33 a	0,91 b
AA	80,17 a	1,03 ab
LDA	78,00 a	0,91 b
CV(%)	2,96	11,42

Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

De acordo com os resultados, o meio de cultura BDA propiciou o maior crescimento micelial (83,16mm) do fungo, seguido dos meios CDA (81,33mm), AA (80,17mm) e LDA (78,00mm), no entanto sem haver diferença estatística significativa entre estes (Tabela 1). De maneira similar, Follstad (1966) estudando o efeito de meios de cultura em vários fungos,

observou maior crescimento de *B. cinerea* em BDA. Hawker (1957) e Barnett (1972) consideram que, em geral, o efeito favorável dos nutrientes sobre o crescimento micelial é paralelo a produção de estruturas de frutificação e esporos.

Em relação as taxas de crescimento, observou-se que esta foi maior no meio de cultura BDA (1,23mm/h), sendo superior as demais e diferindo estatisticamente de LDA e CDA, sem no entanto diferir do AA (Tabela 1). Apesar da taxa de crescimento micelial nos meios CDA e LDA terem sido menores, o fungo manteve uma curva de crescimento uniforme ao longo do tempo de observação, atingindo o diâmetro total da placa ao final de 5 dias em todos os meios testados (Figura 1). Com relação ao requerimento nutricional, aparentemente, todos os meios apresentaram em sua constituição os elementos necessários ao crescimento do fitopatógeno.

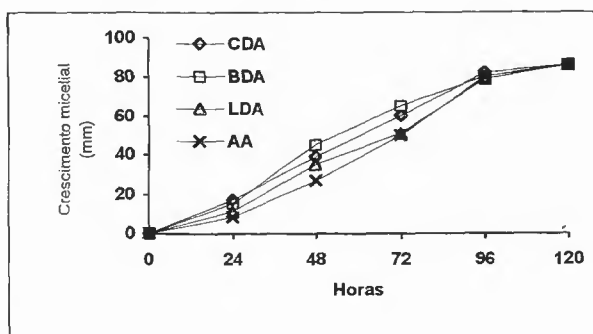


Figura 1 – Curva de crescimento de *Botrytis cinerea* nos diferentes meios de cultura, após cinco dias de avaliação.

Os resultados da esporulação para o isolado de *B. cinerea*, demonstraram a superioridade do meio LDA nesse aspecto, o qual induziu a maior produção de conídios ($7,60 \times 10^4$ conídios/mL), seguido em ordem decrescente por AA ($2,00 \times 10^4$ conídios/mL), BDA ($1,36 \times 10^4$ conídios/mL) e por último CDA ($1,13 \times 10^4$ conídios/mL) (Figura 2a). A maior esporulação de *B. cinerea* ocorreu em LDA, sendo superior ao meio BDA, no qual obteve-se maior crescimento micelial. Segundo Cochrane (1958) e Griffin (1994), um excelente meio de cultura para o crescimento de determinado organismo poderá não ser o mesmo para produção de esporos e vice-versa.

Apesar do excelente crescimento proporcionado pelos meios de cultura testados, diferenças na esporulação foram observadas, indicando que em alguns casos o crescimento vegetativo ocorreu em detrimento da produção de conídios. O meio de cultura BDA é usado rotineiramente para o isolamento e estudo de muitos fungos, entretanto, vários trabalhos têm demonstrado variações na resposta do

crescimento dos fungos em cultivo, principalmente, na taxa, aspectos culturais, crescimento micelial e esporulação, tanto para *B. cinerea* (Ogawa *et al.*, 1978), quanto para outros fungos (Lopes & Bergamin Filho, 1993; Queiroz & Menezes, 1993).

De acordo com Lilly & Barnett (1951), as condições nutricionais sob as quais os fungos esporulam são completamente diferentes daquelas julgadas ótimas para o crescimento micelial ou vegetativo, bem como, não apenas a quantidade de nutrientes, mas o próprio balanço entre os componentes do meio pode ser essencial para a máxima esporulação. Em condições normais, *B. cinerea* produz esporos em cinco dias de cultivo (Follstad, 1966), contudo, vários fatores podem estar relacionados ou afetar a esporulação fúngica, como a concentração disponível de oxigênio, a umidade, o tempo de incubação, a quantidade de nutrientes, o balanço nutricional do meio, a temperatura, o potencial osmótico do meio de cultura e a luminosidade (Alderman & Lacy, 1983; Maas, 1984; Thomas *et al.*, 1988).

O peso seco de *B. cinerea* apresentou variações nos diferentes meios de cultura líquidos testados (Figura 2b). Constatou-se que *B. cinerea* apresentou maior peso seco quando cultivado em meio AA, entretanto, este resultado pode ter sido influenciado por outros fatores que apenas o peso seco do fungo, como a aglutinação dos componentes no meio de cultura, o que impossibilitaria a retirada apenas do crescimento micelial do fungo. Segundo Cochrane (1958), o peso seco é a maneira mais utilizada para medir o crescimento de fungos porém, sua limitação é que este pode refletir a acumulação de polissacarídeos ou materiais de reserva, ao invés da síntese no protoplasma.

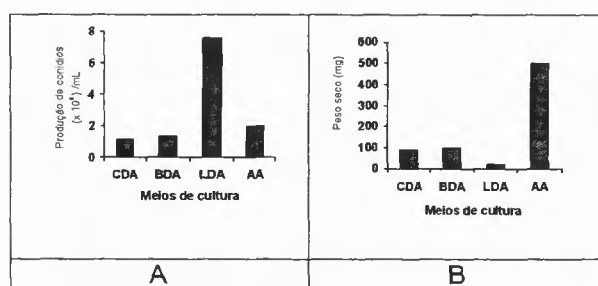


Figura 2- Produção de conídios (A) e peso seco (B) de *B. cinerea* nos diferentes meios de cultura, após 5 dias de avaliação.

O menor peso seco foi induzido pelo meio LDA, o qual promoveu um crescimento uniforme e a maior esporulação do fungo, contrastando com a correlação positiva entre o peso seco e o crescimento micelial verificada por Alderman & Lacy (1983), no patossistema *B. alli* e cebola. Apesar de menos nutrido no meio de

cultura LDA, as exigências nutricionais de *B. cinerea* foram atendidas, permitindo o crescimento e a esporulação do fungo.

O conhecimento das melhores condições para o crescimento e desenvolvimento dos fungos, reveste-se de fundamental importância, pois auxiliam diversas pesquisas, como no melhoramento visando a seleção de fontes de resistência às doenças ou em estudos envolvendo a natureza da resistência, devido a grande quantidade de conídios necessários para testar as populações de plantas (Voltz & Jones, 1981). Além disso, a abundante produção de conídios viáveis do patógeno em meios de cultura é importante para estudos genéticos, citológicos e taxonômicos de fungos (Queiroz & Menezes, 1993).

Os resultados evidenciaram que os meios de cultura influenciaram significativamente na taxa de crescimento, esporulação e peso seco de *B. cinerea*.

ABSTRACT

Influence of culture media on growth, sporulation, and dry weight of *Botrytis cinerea*

The mycelial growth, growth rate, dry weight and sporulation of *Botrytis cinerea* in relation to the culture media BDA, CDA, LDA and AA, under conditions of continuous light were studied. All the culture media induced a good growth, however, the medium BDA presented the highest rate, followed by the media CDA, LDA and AA. In relation to the conidium production, the results showed that the highest sporulation was obtained in culture medium LDA, when compared with the other tested media and smallest in BDA and CDA. The highest dry weight was observed in the culture medium AA and the smallest in LDA. The results showed that the culture media influenced significantly in the mycelial growth rate, sporulation and dry weight of *B. cinerea*.

Key words: *Botrytis cinerea*, culture media, strawberry, growth, sporulation, dry weight, growth rate.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ALDERMAN, S.C.; LACY, M.L. Influence of water potential and temperature on growth of *Botrytis alli* on agar and dried onion leaves. *Phytopathology*, St. Paul, v.73, n.7, p.785, 1983.
- 2 ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. *Introductory mycology*. 3rd Ed. New York: John Wiley & Sons, 1979. 632 p.
- 3 BARNETT, H.L. *Fungus physiology* rescareb at the west Virginia Agricultural and Forest Experiment Station, 1922-1882. Morgantown: West Virginia University, 1972. 113p.
- 4 CABRINI, H.; KIMATI, H. Ocorrência de isolados de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. resistentes a benomyl em morangos (*Fragaria* spp.) no estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v.12, n.1, p.16, 1986.
- 5 COCHRANE, V.W. *Physiology of fungi*. New York: John Wiley & Sons, 1958. 438p.

- 6 FOLLSTAD, M.N. Mycelial growth rate and spoilation of *Alternaria tenuis*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum* and *Rhizopus stolonifer* in low-oxygen atmospheres. **Phytopathology**, St Paul, v.56, n.10, p.1098-1099, 1966.
- 7 GHINI, R. Ocorrência de resistência a fungicidas em linhagens de *Botrytis cinerea*, no estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, n.2, p.285-288, 1996.
- 8 GHINI, R.; VITTI, A.J. Controle integrado de *Botrytis cinerea* na cultura do morango. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.19, n.1, p.10-13, 1993.
- 9 GRIFFIN, D.H. **Fungal physiology**. NewYork: John Wiley & Sons, 1994. 458p.
- 10 HAWKER, L.E. **The physiology of reproduction in fungi**. Cambridge: University Press, 1957. 120 p.
- 11 LILLY, V.G.; BARNETT, H.L. **Physiology of the fungi**. New York: McGraw-Hill, 1951. 464p.
- 12 LOFES, S.A.; BERGAMIN FILHO, A. Efeito de meios de cultura e regimes de luz na esporulação de *Bipolaris sacchari*. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.19, n.2, p.105-107, 1993.
- 13 MASS, J.L. Gray mold. In: MASS, J.L. (Ed.) **Compendium of strawberry diseases**. St. Paul: The APS Press, 1984. p.56-57
- 14 OGAWA, J.M.; GILPATRICK, J.D.; UYEMOTO, J.K.; ABAWI, G.S. Variations in fungal growth on various preparations of potato-dextrose-agar media. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v.62, n.4, p.437-441, 1978.
- 15 PENG, G.; SUTTON, I. C. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v.13, p.247-257, 1991.
- 16 QUEIROZ, F.M.; MENEZES, M. Efeito de meios de cultura e do regime de luz na esporulação de *Cercospora nicotianae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, n.4, p.545-547, 1993.
- 17 THOMAS, C.S.; MAROIS, J.J.; ENGLISH, J.T. The effects of wind speed, temperature, and relative humidity on development of aerial mycelium and conidia of *Botrytis cinerea* on grape. **Phytopathology**, St. Paul, v.78, n.2, p.260-265, 1988.
- 18 WOLTZ, S.S.; JONES, J.P. Nutricional requeriments of *Fusarium oxysporum*: basis for a disease. In: NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; COOK, R.J. (Eds.) **Fusarium: diseases, biology and taxonomy**. University Park: The Pennsylvania State University, 1981. p.340-350