

Influência de meios de cultura e regimes de luz no crescimento micelial, esporulação, dimensão de conídios e peso seco de *Fusarium equiseti*

Viviane J.L.B. RODRIGUES¹; Elineide B. da SILVEIRA¹; Paulo F. FORTES FILHO¹; Eduardo H. de A. MARANHÃO²; Maria MENEZES¹

RESUMO: Foi testada a influência de três meios de cultura (BDA, batata-dextrose-agar; CDA, cenoura-dextrose-agar; VDA, vagem-dextrose-agar) e três regimes de luz (CC, claro contínuo; AL, alternância luminosa; EC, escuro contínuo) no crescimento micelial, esporulação, dimensão de conídios e peso seco de um isolado de *Fusarium equiseti*. O maior crescimento micelial, observado no quinto dia de incubação, foi obtido no meio VDA em claro contínuo e alternância luminosa, enquanto que a maior esporulação foi verificada no meio VDA sob alternância luminosa. Em ambos os parâmetros foi observada diferença significativa nas condições de luminosidade. As dimensões dos conídios não foram afetadas pelos meios de cultura e regimes de luminosidade. O maior peso seco foi obtido no meio VD sob regime de alternância luminosa. As condições que proporcionaram maior crescimento micelial também induziram ao maior peso seco.

Palavras chave: *Fusarium equiseti*; fisiologia; fungo; algodão.

INTRODUÇÃO

Fusarium equiseti (Corda) Sacc. é um componente importante do complexo de bioagentes causadores de damping-off e podridão de raízes e sementes em muitas culturas como milho (*Zea mays*), feijão (*Phaseolus vulgaris*) e algodão (*Gossypium* spp.) (Melero-Vara & Jiménez-Díaz, 1990).

Em algodoeiro está relacionado com a podridão de maçãs e também infecta sementes através da colonização do xilema (Rudolph & Harrison, 1945).

No Brasil, Balmer *et al.* (1967) determinaram a frequência e a importância econômica de fungos causadores de podridão de maçãs de algodoeiro, em vinte e um municípios do Estado de São Paulo. *Colletotrichum gossypii*, *Botryodiplodia* sp. e *Fusarium* sp. foram considerados os mais importantes, sendo que, no caso de *Fusarium*, a obtenção de diversos isolados com colônias de colorações diferentes sugeriu o envolvimento de espécies diferentes deste patógeno, entre estas, *F. equiseti*. Na Índia, Sharma & Sandhu (1985) relataram a ocorrência de podridão de maçãs de *Gossypium arboreum* L. causada exclusivamente por *F. equiseti*.

Geralmente, a condição nutricional ótima para crescimento vegetativo de um fungo não é necessariamente a melhor para a produção de esporos. A concentração mínima de nutrientes que permite o crescimento micelial é raramente, ou nunca, suficiente para a produção de esporos. Sabe-se que certos meios naturais são mais favoráveis à esporulação, em relação aos meios sintéticos padronizados. Estes meios naturais geralmente contêm carboidratos complexos, cujo efeito pode ser favorável à esporulação. Meios sintéticos contêm glucose como fonte de carbono e este açúcar, sendo prontamente assimilado pela maior parte dos fungos, induz a um vigoroso crescimento micelial. Carboidratos mais complexos são freqüentemente menos adequados para a

produção de hifas vegetativas, porém podem ser mais adequados para a produção de esporos (Lukens, 1963). Além disso, condições ambientais favoráveis para a produção do micélio podem ser inadequadas para a esporulação, como é o caso da luminosidade. Diferentes fungos variam consideravelmente em sua resposta à luz. Muitos fungos imperfeitos esporulam bem quando iluminados, mas na escuridão total não produzem esporos ou o fazem pobremente (Leach, 1967). Para outros, foi demonstrado que além do requerimento de luz para o estímulo à esporulação, é necessário um período subsequente de escuro para realização do processo (Aragaki, 1961; Lukens, 1963).

A influência da luz e meio de cultura no crescimento micelial, esporulação e morfologia de macroconídios nas espécies de *Fusarium* é largamente aceita. Apesar dessa concordância, as informações existentes na literatura a respeito da variabilidade das diversas espécies de *Fusarium* são inconsistentes devido a falta de uniformidade nas técnicas e métodos usados na propagação e cultivo do fungo (Awuah & Lorbeer, 1989). Em *F. equiseti*, além de inconsistentes, as informações são escassas.

Em vista disto, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de fornecer informações básicas para futuros trabalhos que envolvam determinação de crescimento micelial ou esporulação e obtenção de grandes quantidades de conídios desse patógeno.

MATERIAL E MÉTODOS

O isolado do fungo *F. equiseti* foi proveniente da Micoteca do Laboratório de Micologia - Área de Fitossanidade do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Meios de Cultura e Regimes de Luz - Foram utilizados os meios de cultura sólidos: (Batata-Dextrose-Ágar (BDA - 200g de batata; 20g de

¹UFRPE/DEPA-Fitossanidade, 52171-900, Recife-PE

²IPA, C.P. 003, 55600-000, Vitória de S^o Antão-PE

dextrose; 17g de ágar; 1000mL de água destilada); Cenoura-Dextrose-Ágar (CDA - 200g de cenoura; 20g de dextrose; 17g de ágar; 1000mL de água destilada) e Vagem-Dextrose-Ágar (VDA - 200g de vagem; 20g de dextrose; 17g de ágar; 1000mL de água destilada esterilizada) e os meios líquidos Batata-Dextrose (BD); Cenoura-Dextrose (CD) e Vagem-Dextrose (VD).

Os regimes de luz utilizados foram: claro contínuo (CC), escuro contínuo (EC) e alternância luminosa (AL) (fotoperíodo de 12h de claro e 12h de escuro). Como fonte de luz foi utilizada uma lâmpada fluorescente (40 Watts), colocada 30cm acima das placas. Escuro contínuo foi obtido colocando-se as placas em local isento de luz.

Efeito dos Substratos e Luminosidade no Crescimento Micelial, Esporulação e Dimensão de Conídios - Discos de meio de cultura BDA com micélio de *F. equiseti*, medindo 5mm de diâmetro, foram colocados no centro de placas de Petri contendo os diferentes meios de cultura. Após este procedimento, três placas de cada tratamento foram mantidas sob os diferentes regimes de luz, a uma temperatura em torno de 25°C.

A avaliação do crescimento micelial foi efetuada diariamente através de medições do diâmetro das colônias em dois sentidos diametralmente opostos, até um dos tratamentos alcançar o diâmetro completo da placa (90mm).

A esporulação foi determinada com o auxílio de uma câmara de Neubauer, após cinco dias de incubação. Para esta determinação, foram utilizadas suspensões de esporos preparadas a partir da remoção da superfície da colônia, com auxílio de uma escova de cerdas macias, e adição de 20mL de água destilada e esterilizada contendo Tween 80 (1:100) por placa, fazendo-se a filtração através de camada dupla de gaze.

Foi verificada na mesma suspensão utilizada para determinar a esporulação, a dimensão dos conídios. Gotas de hipoclorito de sódio (3:100) foram adicionadas às suspensões, visando inibir a germinação dos esporos e, através de uma lente micrométrica, procedeu-se a medição dos conídios tomando-se ao acaso 20 unidades por lâmina, para cada repetição.

Efeito dos Substratos e Luminosidade no Peso Seco - Discos de meio de cultura BDA com micélio de *F. equiseti*, medindo 5mm de diâmetro, foram colocados em 100mL dos meios líquidos (BD, CD e VD) contidos em Erlenmeyers de 250mL. Os Erlenmeyers foram incubados à temperatura de 27°C nos três regimes de luz já referidos, durante o período de cinco dias.

Diariamente foram agitados duas vezes, para renovação do ar.

Para determinação do peso seco, o meio contendo o crescimento fúngico foi filtrado em tecido de nylon, e a massa retida na malha, colocada em recipiente de alumínio previamente tarado. O material foi mantido em estufa a 80°C, durante 21h, após o qual procedeu-se a pesagem.

Em todos os experimentos utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3 x 3 (meios de cultura x regimes de luz), com três repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os meios de cultura e os regimes de luz influenciaram significativamente o crescimento micelial de *F. equiseti* (Tabela 1). O maior crescimento micelial foi obtido na interação VDA e claro contínuo (CC) e alternância luminosa (AL), o qual diferiu significativamente dos demais tratamentos.

Tabela 1- Efeito de diferentes meios de cultura e regimes de luz no crescimento micelial de *Fusarium equiseti*, aos cinco dias de incubação

Meio de Cultura	Regimes de luz		
	CC	AL	EC
VDA	84,50 a A	84,50 a A	75,17 a B
CDA	77,50 b A	75,83 b A	69,17 b B
BDA	76,50 b A	73,33 b AB	70,67 b B

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

As diferenças detectadas no crescimento micelial de *F. equiseti* nos vários regimes de luz evidenciaram a influência determinante da luz nesta variável. Considerando-se o efeito da luminosidade, nos diferentes meios, verificou-se que o claro contínuo induziu maior crescimento do fungo em relação aos demais regimes de luz, embora não diferindo de alternância luminosa. Cochrane (1958) relata que a luz exerce efeito direto sobre a célula fúngica e não sobre o meio de cultivo, estimulando ou inibindo o crescimento ou esporulação. Minussi *et al.* (1977) trabalhando com *Stemphyllium solani*, observaram que a luz, através de sua qualidade e intensidade, afeta a taxa de crescimento e indução de formação de estruturas reprodutivas, verificando a necessidade de luz contínua para um melhor crescimento micelial, obtendo-se no escuro contínuo um crescimento inferior.

A produção de conídios em alternância luminosa (AL) foi maior que em EC e CC em todos os meios (Tabela 2). O meio BDA em AL, induziu a maior produção de conídios, atingindo uma esporulação média de $6,69 \times 10^5$ conídios/mL.

Também foi observada uma diferença entre o meio de cultura que favoreceu o melhor

crescimento micelial (VDA) e esporulação (BDA), discordando de Barnett (1985), o qual afirmou que em geral, a produção de estrutura de frutificação e esporulação ocorre no mesmo meio do crescimento micelial, demonstrando neste caso, haver poucas evidências sobre a necessidade de um nutriente específico que provoque a esporulação. Cochrane (1958) e Lilly & Barnett (1951) já comentaram amplamente sobre este fato e isto parece depender das exigências particulares de cada organismo na realização dos dois processos fisiológicos.

Cochrane (1958) afirma que a luz influencia a formação de conídios nos fungos imperfeitos, conforme verificado nos dados obtidos no presente trabalho. O mesmo autor comenta que *Fusarium* spp. esporulam pouco no escuro e forma uma zona de esporos após uma breve exposição à luz. A luz inibe o crescimento micelial, induzindo a esporulação. O efeito da luz só se manifesta nas extremidades das hifas em crescimento ativo. A formação de estruturas reprodutivas em anéis concêntricos em placas com ágar ou na planta hospedeira é um fenômeno comum e é influenciado pela alternância de luz com períodos de escuro.

Tabela 2 - Efeito de diferentes meios de cultura e regimes de luz na esporulação de *Fusarium equiseti*, aos cinco dias de incubação

Meios de Cultura	Regimes de luz		
	CC	AL	EC
VDA	2,23 a B	6,69 a A	4,13 a AB
CDA	4,47 a A	5,33 a A	2,71 a A
BDA	2,57 a A	4,62 a A	2,66 a B

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Quanto a dimensão dos conídios (Tabelas 3 e 4), o maior comprimento foi obtido na interação CDA/AL (36,47µm), no entanto sem diferir dos demais tratamentos. A largura não diferiu significativamente nas interações meios de cultura e regimes de luz, tendo em CDA/EC a maior largura (4,28µm). Apesar do regime de luz não ter influenciado significativamente na largura dos conídios, no EC apresentou aumento médio de 21% em relação ao CC no meio CDA. A faixa de variação na dimensão dos conídios, comprimento de 28,44 a 36,47µm e largura de 3,11 a 4,28µm, está de acordo com os dados obtidos por Luttrell (1958), o qual verificou que conídios de *F. equiseti* apresentam comprimento variando de 22 a 60µm e largura de 3,5 a 9,0µm.

Awuah & Lorbeer (1989) demonstraram que a luz é uma das variáveis que pode determinar as características morfológicas de *F. oxysporum* f. sp. *apii*.

Tabela 3 - Efeito de diferentes meios de cultura e regimes de luz no comprimento de esporos de *Fusarium equiseti*, aos cinco dias de incubação

Meios de Cultura	Regimes de luz		
	CC	AL	EC
VDA	28,44 a A	36,47 a A	36,37 a A
CDA	36,16 a A	33,05 a A	30,08 a A
BDA	25,87 a A	36,17 a A	29,69 a A

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Tabela 4 - Efeito de diferentes meios de cultura e regimes de luz na largura de esporos de *Fusarium equiseti*, aos cinco dias de incubação

Meios de Cultura	Regimes de luz		
	CC	AL	EC
VDA	3,38 a A	4,22 a A	4,28 a A
CDA	4,19 a A	3,91 a A	3,56 a A
BDA	3,11 a A	4,21 a A	3,50 a A

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Harter (1939) demonstrou que *F. coeruleum* cultivado em diferentes meios, no escuro e no claro, em temperatura ambiente, mostrou diferenças no comprimento de esporos tri-septados, tendo como substrato vagem cozida (12,7µ) e batata cozida (6,1µ). Ainda de acordo com o autor acima mencionado, tanto a radiação solar como a artificial interfere no tamanho do esporo, sendo que os esporos em iluminação artificial apresentam-se maiores que os produzidos no escuro. Cochrane (1958) afirma que a luz produz efeito positivo no tamanho e septação dos macroconídios em *Fusarium* spp.

O peso seco é a maneira mais utilizada para avaliar o crescimento de fungos, porém a sua limitação é que pode refletir na acumulação de polissacarídeos, ou materiais de reserva, ao invés da síntese de novo protoplasma, segundo Cochrane (1958). O maior peso seco de *F. equiseti* foi verificado no meio VD em AL, porém sem diferir de CC e EC (Tabela 5). Tal resultado evidenciou que as condições que proporcionaram maior crescimento micelial também induziram a obtenção de maior peso seco. De maneira geral, esta variável também foi influenciada significativamente pelo meio de cultura e regime de luz.

Tabela 5 - Efeito de diferentes meios de cultura e regimes de luz no peso seco de *Fusarium equiseti*, aos cinco dias de incubação

Meios de Cultura	Regimes de luz		
	CC	AL	EC
VDA	112,33 a A	116,67 a A	105,00 a A
CDA	124,00 a A	104,67 ab AB	42,33 a B
BDA	34,67 b A	42,33 b A	44,33 a A

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Portanto, o conhecimento das condições favoráveis ao bom desempenho vegetativo e

reprodutivo de *F. equiseti*, torna-se de grande importância para a realização de estudos envolvendo os postulados de Koch, identificação de cultivares resistentes ao patógeno, nutrição, taxonomia com base morfológica e genética, além de outras aplicações.

ABSTRACT

Influence of culture media and light regimes on the mycelial growth, sporulation, conidia size and dry weight of *Fusarium equiseti*

The effect of three culture media (PDA, potato-dextrose-agar; CDA, carrot-dextrose-agar; VDA, pod-dextrose-agar) and three light conditions (CL, continuous light; AL, alternative light; CD, continuous dark) on the mycelial growth, sporulation, conidia dimension and dry weight of a colony of *Fusarium equiseti* were studied. A superior mycelial growth, observed at the 5th day of incubation, was obtained with the VDA medium on continuous light and alternative light, while a superior sporulation was observed on the VDA medium under alternative light. In both variables a significant difference of light conditions was observed. The conidia dimensions were not affected by culture media and light conditions. The highest dry weight was obtained with the VD medium under alternative light conditions.

Key words: *Fusarium equiseti*; physiology; fungus; cotton.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1
ARAGAKI, M. Radiation and temperature interaction on the sporulation of *Alternaria tomato*. *Phytopathology*, St. Paul, v.51, n.11, p.803-805, 1961.
- 2
AWUAH, R.T.; LORBEER, J.W. Role of light, temperature and method of propagation in cultural variability of *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* race 2. *Mycologia*, Bronx, v.81, n.2, p.278-283, 1989.
- 3
BALMER, E.; CRUZ, B.P.B.; SILVEIRA, A.P. da. Ocorrência de fungos que afetam as maçãs do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) no Estado de São Paulo. *Arquivo do Instituto Biológico*, São Paulo, v.34, p.161-167, 1967.
- 4
BARNETT, H. L. Fungus physiology research at the west Virginia agricultural and forestry experiment station, 1922-1982. Morgantown: West Virginia University, 1985. 113 p.
- 5
COCHRANE, V. W. *Physiology of fungi*. New York: John Wiley, 1958. 438 p.
- 6
HARTER, L.L. Influence of light on the length of the conidia in certain species of *Fusarium*. *American Journal of Botany*, Columbus, v.26, p.234-243, 1939.
- 7
LEACH, C.M. Interaction of near ultraviolet light and temperature on sporulation of the fungi *Alternaria*, *Cercospora*, *Fusarium* *Helminthosporium* and *Stemphylium*. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.45, p.1999-2016, 1967.
- 8
LILLY, V.G.; BARNETT, H.C. *Physiology of the fungi*. New York: McGraw Hill, 1951. 464 p.
- 9
LUKENS, R.J. Photo-inhibition of sporulation in *Alternaria solani*. *American Journal of Botany*, Columbus, v.50, p.720-724, 1963.
- 10
MELERO-VARA, J.M.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. Etiology, incidence and distribution of cotton seedling damping-off in Southern Spain. *Plant Disease*, St. Paul, v.74, n.8, p.597-600, 1990.
- 11
MINUSSI, E. et al. Efeitos de diferentes regimes de luz na esporulação de *Stemphylium solani* Weber em meio de cultura. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.2, n.2, p.167-171, 1977.
- 12
RUDOLPH, B.A.; HARRISON, G.J. The invasion of the internal structure of cotton seed by certain fusaria. *Phytopathology*, St. Paul, v.35, p.542-548, 1945.
- 13
SHARMA, Y.R.; SANDHU, B.S. A new fungus associated with boll rot of *Arboreum* cotton. *Current Science*, Columbus, v.54, p.936, 1985.