

Influência de meios de cultura, luminosidade e fontes de carbono e nitrogênio sobre *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc., agente causal da antracnose da acerola (*Malpighia glabra* L.)

Valbérico de Albuquerque CARDOSO¹; Sônia Maria Alves de OLIVEIRA¹; Maria MENEZES¹; Rosa de Lima Ramos MARIANO¹

RESUMO: A acerola ou cereja das Antilhas produz pequenos frutos que são utilizados no consumo *in natura*, despertando o interesse para novos plantios em diferentes Estados do Brasil. Neste trabalho de pesquisa, foi estudado a influência de cinco meios de cultura (aveia-dextrose-água, ADA; batata-dextrose-água, BDA; cenoura-dextrose-água, CDA; czapek-água, CZA; vagem-dextrose-água, VDA), três regimes de luminosidade (claro contínuo-CC; escuro contínuo-EC; alternância luminosa-AL), quatro combinações de fontes de carbono (dextrose, sacarose, maltose, xilose) e quatro de nitrogênio (asparagina, arginina, peptona, nitrato de potássio) sobre as características fisiológicas e morfológicas de *Colletotrichum gloeosporioides*. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial com quatro repetições/tratamento. O crescimento micelial foi determinado diariamente, a esporulação e as características morfológicas após oito dias de incubação. Observou-se que o meio CDA em CC e AL promoveu maior crescimento micelial e este meio submetido aos três regimes de luz as maiores produções de conídios. Nas combinações de C x N onde o nitrato de potássio encontrava-se associado as fontes de C propiciou maior crescimento micelial e na produção de conídios os meios continham sacarose ou maltose como fonte de C e arginina como fonte de N. Na caracterização morfológica dos conídios, provenientes dos diferentes meios de cultura, regimes de luz e combinações de fontes de C x N, as médias de comprimento e largura obedeceram ao padrão morfológico da espécie estudada.

Palavras chave: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Malpighia glabra*, fisiologia, nutrição, morfologia.

INTRODUÇÃO

A acerola ou cereja das Antilhas (*Malpighia glabra* L.) é muito apreciada por produzir frutos com alto teor de ácido ascórbico (vitamina C), cerca de 1 a 3g por 100g de suco (Asenjo & Gúzman, 1946). Além desta vitamina, a acerola contém ainda tiamina, riboflavina, e niacina em pequena quantidade, representando também boa fonte de ferro, cálcio, fósforo, proteínas e carboidratos (Simão, 1971). A acerola é originária da Índia e durante muitos séculos os frutos usados pelos nativos, sendo introduzida nos Estados Unidos através de Havana, Cuba, por volta de 1880, onde era cultivada em quintais, no sul e parte central da Flórida, inicialmente como planta ornamental, pelo colorido dos seus frutos (Ledin, 1958; Simão, 1971).

Com o aumento da população de plantas cultivadas de acerola, começaram a surgir problemas de natureza fitossanitária, destacando-se entre eles, a antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. No Estado de Pernambuco, a acerola tem se mostrado suscetível a antracnose e o *C. gloeosporioides* tem sido isolado com muita frequência de frutos exibindo sintomas da doença, caracterizados por lesões deprimidas, aproximadamente circulares, podendo afetar as folhas causando lesões circulares, coloração parda escura com halo clorótico (Oliveira *et al.*, 1994).

Muitos trabalhos que tiveram por objetivo o estudo do efeito da luz na indução ou inibição do crescimento de fungos, têm sido melhor explicado qualitativamente do que quantitativamente. Os dados disponíveis sobre o espectro de ação da luz, indicam que o comprimento de onda ideal ao crescimento

encontra-se na região azul do espectro (Cochrane, 1958). Em estudos sobre a fisiologia da germinação de esporos fúngicos, Gottlieb (1950) concluiu que frequentemente a radiação luminosa altera o comportamento dos mesmos, algumas vezes inibindo a germinação e, mais raramente, estimulando esse processo. A variação da luminosidade não teve efeito sobre a esporulação de *C. lindemuthianum* (Mathur *et al.*, 1950), enquanto que a alternância luminosa aumentou a produção de esporos de *C. destructivum*, quando comparada com a ausência de luz (Sievert, 1971). No caso de *C. coccodes* esporulou melhor sob luz contínua (Barksdale, 1967).

Além da influência da luz, da umidade e da temperatura, a nutrição tem papel fundamental na esporulação e viabilidade dos esporos de fungos. De um modo geral, os meios de cultura naturais ou semi-sintéticos estimulam o crescimento e esporulação de espécies de *Colletotrichum* (Greene & Morales, 1967; Minussi & Kimati, 1978; Welty & Collins, 1979).

Muitas fontes de carbono têm sido usadas para promoção do crescimento e esporulação de fungos, entre elas as pentoses (arabinose, xilose, raminose), hexoses (glicose, frutose, galactose, manose, sorbose), dissacarídeos (lactose, maltose, sacarose), trissacarídeos (rafinose), polissacarídeos (dextrina, inulina, amido), ácidos orgânicos (ácido tartárico, ácido málico) e os açúcares do grupo alcoólico (sorbitol, dulcitol, manitol, glicerol) (Cochrane, 1958; Tandon & Chandra, 1962; Chaturvedi, 1965; Greene & Morales, 1967; Ferraz, 1977). Fontes de nitrogênio são utilizadas no desenvolvimento dos fungos. Entre as inorgânicas (compostos de amônia, nitrito e nitrato) e entre as orgânicas os ácidos

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

monoamino monocarboxílico (DL-alanina, glicina, DL-leucina, DL-fenilalanina, DL-valina), os ácidos monoamino dicarboxílico (DL-ácido aspártico, DL-ácido glutâmico), os aminoácidos básicos (L-histidina, L-arginina), as amidas (acetamida, L-asparagina), a proteína (peptona) e as aminas (uréia, thiourea) (Mathur *et al.*, 1950; Cochrane, 1958; Tandon & Chandra, 1962; Kurtz & Fergus, 1964; Chaturvedi, 1965). O desenvolvimento dos fungos pode sofrer modificações de acordo com a fonte de carbono e/ou nitrogênio utilizada no trabalho de pesquisa.

Algumas revisões foram realizadas sobre o gênero *Colletotrichum*, destacando-se entre elas, a de Von Arx (1957) o qual colocou cerca de 600 espécies em sinonímia com *C. gloeosporioides*, sendo portanto considerada uma espécie grupo, muito comum e com ampla gama de hospedeiro. Nesta descrição, os conídios são retos, obtuso nas extremidades, com comprimento variando de 9-24µm x 3-4,5µm. Os apressórios apresentam comprimento variando de 6-20µm x 4-12µm, são clavados ou irregulares, algumas vezes adequadamente complexos (Sutton, 1980), podendo variar conforme as condições de cultivo.

Levando-se em consideração a importância dos frutos de acerola e a alta incidência da antracnose, a presente pesquisa teve como objetivo estudar o agente etiológico da doença, quanto aos aspectos fisiológicos e morfológicos, cujos resultados servirão de subsídios para o desenvolvimento de outros estudos referentes a aplicação de medidas racionais de controle.

MATERIAL E MÉTODOS

Em todos os experimentos realizados utilizou-se um isolado do fungo *C. gloeosporioides* obtido a partir de frutos de acerola, coletados no campus do Departamento de Agronomia/UFRPE, Recife, PE.

A partir de cultura pura de *C. gloeosporioides*, fez-se a transferência para placas de Petri, contendo BDA (Batata-Dextrose-Ágar), as quais foram incubadas sob luz contínua, durante cinco dias. Após esse período, utilizando-se um vasador de rolha de 5mm de diâmetro, retirou-se assepticamente, discos que foram colocados no centro de placas de Petri contendo os meios ADA (flocos de aveia - 20g; sacarose - 5g); BDA (batata - 200g; dextrose - 20g); CDA (cenoura - 200g; dextrose - 20g); CZA (sacarose - 30g; NaNO₃ - 3g; K₂HPO₄ - 1g; MgSO₄.7 H₂O - 0,5g; KCl - 0,5g; FeSO₄.7 H₂O - 0,01g); VDA (vagem de feijão - 200g; dextrose - 15g), em todos os meios foi adicionado 17g de agar e completados para 1000 mL como volume final (Tuite, 1969).

As placas de Petri foram incubadas por oito dias, sob três regimes de luminosidade: claro contínuo (CC), escuro contínuo (EC) e alternância luminosa (AL) - 12 horas claro/12 horas escuro, a temperatura média de 25±2°C. Para a verificação do efeito das fontes de C e N sobre o crescimento e esporulação de *C. gloeosporioides*, foi utilizado o meio basal de Lilly & Barnett (1951): MgSO₄. 7 H₂O - 0,5g; KH₂PO₄ - 1,5g; agar - 17g; água destilada - 1000 mL, ao qual foi adicionado fontes de C (dextrose, sacarose, maltose e xilose) e de N (asparagina, peptona, nitrato de potássio e arginina) na proporção de 10 partes de C para uma parte de N, baseado no peso molecular de cada substância, sendo as placas incubadas sob alternância luminosa, durante oito dias.

O crescimento micelial foi determinado diariamente através da medição da colônia em dois sentidos diametralmente opostos e a produção de conídios quantificada aos oito dias após incubação, utilizando-se câmara de Neubauer obtendo-se um número médio de conídios/mL.

No estudo morfológico dos conídios, utilizou-se uma ocular micrométrica, tomando-se amostras compostas de 50 unidades/tratamento/repetição. Além do comprimento e largura dos conídios, observou-se sua forma e coloração, comparando-as com os resultados descritos na literatura por Von Arx (1957) e Sutton (1980).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial, com quatro repetições/tratamento e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados de esporulação foram transformados em $\sqrt{x+1}$. A avaliação consistiu na medição do crescimento micelial, na quantificação de esporos e na observação da morfologia dos conídios de *C. gloeosporioides*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Meios de cultura e regimes de luminosidade -

Todos os meios de cultura testados promoveram bom crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, não sendo observada diferenças significativas entre os tratamentos. Os regimes de luminosidade juntamente com os meios de cultura utilizados demonstraram que o fitopatógeno não sofreu influência significativa no seu crescimento micelial, sendo mais pronunciado na combinação CDA x CC, ADA x EC e CDA x AL (Figura 1). Este resultado está de acordo com os trabalhos de Lilly & Barnett (1951), Hawker (1957, 1966), Cochrane (1958), os quais observaram que a luz, geralmente, apresenta pouco efeito sobre o crescimento micelial da maioria dos fungos.

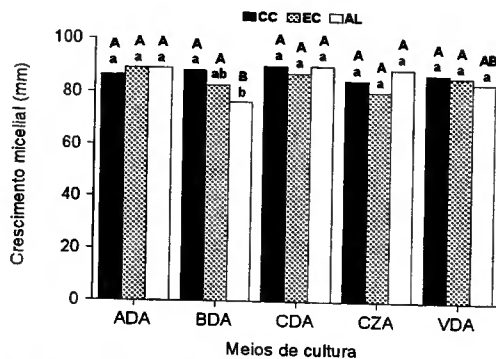


Figura 1 - Efeito do regimes de luminosidade e meios de cultura no crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, aos oito dias de incubação. ADA (aveia-dextrose-água); BDA (batata-dextrose-água); CDA (cenoura-dextrose-água); CZA (Czapek-água); VDA (vagem de feijão-dextrose-água); CC (claro contínuo); EC (escuro contínuo); AL (alternância luminosa).

A produção de conídios (Figura 2) sofreu a interferência dos regimes de luz e meios de cultura utilizados, sendo o meio CDA, independente do regime de luz, o que propiciou maior esporulação com destaque para o tratamento CDA x CC ($81,47 \times 10^5$ con./mL). Resultado semelhante foi obtido por Sievert (1971), quando este obteve maior esporulação de *C. destructivum* sob regime de alternância luminosa.

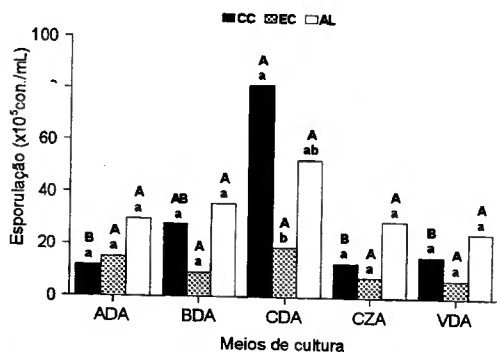


Figura 2 - Efeito do regime de luz e meios de cultura sobre a esporulação de *Colletotrichum gloeosporioides*, aos oito dias de incubação. ADA (aveia-dextrose-água); BDA (batata-dextrose-água); CDA (cenoura-dextrose-água); CZA (Czapek-água); VDA (vagem de feijão-dextrose-água); CC (claro contínuo); EC (escuro contínuo); AL (alternância luminosa).

Os meios semi-sintéticos como o BDA e CDA apresentaram as maiores produções de conídios, o que é explicado por Mathur *et al.* (1950), onde citam que estes meios têm na sua composição fatores os quais estimulam a produção de esporos. Em trabalhos desenvolvidos para muitos fungos e vários tipos de meios de cultura, Lilly & Barnett (1951) concluíram que os meios naturais ou semi-sintéticos fornecem certas substâncias naturais presentes nos decoctos, que funcionam como fatores estimuladores do desenvolvimento

destes organismos, tornando-os mais eficientes do que os meios sintéticos.

Fontes de Carbono x Nitrogênio

Na Figura 3 encontra-se o resultado do estudo da influência das combinações entre as fontes de carbono e nitrogênio sobre o crescimento micelial e esporulação de *C. gloeosporioides*, observando-se que nas combinações onde o nitrato de potássio encontrava-se presente, independente da fonte de carbono, apresentou os maiores crescimentos miceliais do patógeno em questão.

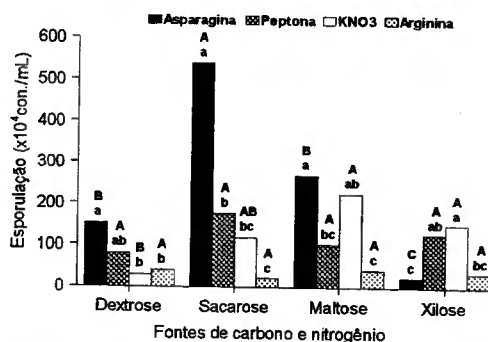
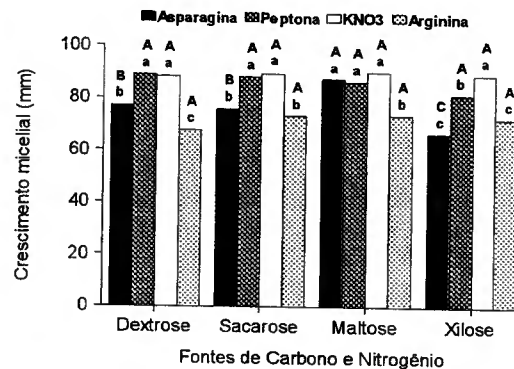


Figura 3 - Crescimento micelial e esporulação de *Colletotrichum gloeosporioides* submetido a diferentes combinações de fontes de carbono e nitrogênio, aos oito dias de incubação, em alternância luminosa.

No tocante a produção de conídios, os meios contendo sacarose e maltose como fonte de carbono e arginina como fonte de nitrogênio, induziram, em geral, a maior esporulação de *C. gloeosporioides*.

Tandon & Chandra (1962) e Chaturvedi (1965) obtiveram resultados semelhantes quanto ao efeito favorável dos dissacarídeos, maltose e sacarose, no crescimento e esporulação de *C. gloeosporioides*. Estes autores, comentaram que o insucesso da xilose como fonte de carbono deve-se, provavelmente, a sua conformação molecular dificultando a assimilação pelo fitopatógeno.

No estudo da morfologia dos conídios, provenientes dos diferentes meios de culturas x regimes de luminosidade e das combinações de

fontes de carbono e nitrogênio (Figura 4), observou-se que as médias para o comprimento e a largura dos conídios foram semelhantes as obtidas por Ferraz (1977), Sutton (1980), Cox & Irwin (1988) e Oliveira et al. (1994), confirmando a espécie de *Colletotrichum* em questão.

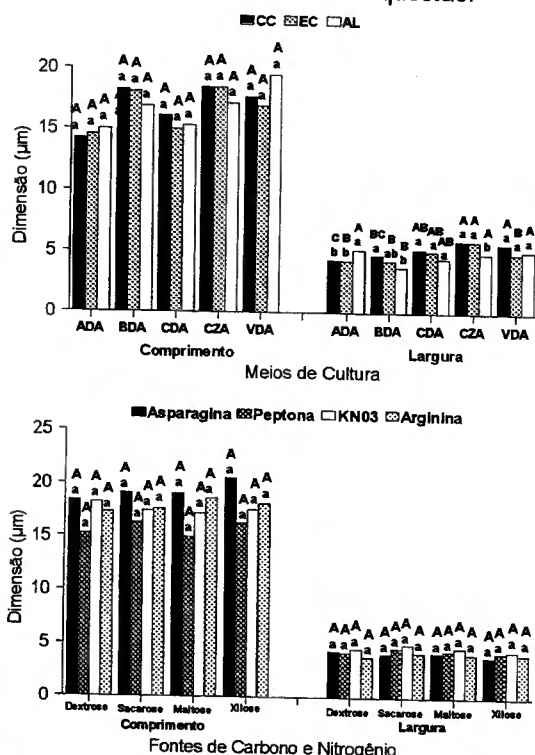


Figura 4 - Efeito do regime de luz, meios de cultura e a combinação de fontes de carbono e nitrogênio sobre o comprimento e largura dos conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*. ADA (aveia-dextrose-água); BDA (batata-dextrose-água); CDA (cenoura-dextrose-água); CZA (Czapek-água); VDA (vagem de feijão-dextrose-água); CC (claro contínuo); EC (escuro contínuo); AL (alternância luminosa).

ABSTRACT

Influence of culture media, luminosity, carbon and nitrogen sources on *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of antracnose of *Malpighia glabra*

The west indian cherry (*Malpighia glabra*) produces small fruits that are used in the in natura consumption, waking up the interest for new plantations in different States of Brazil. In this research work, it was studied the influence of five culture media (oat-dextrose-água, ODA; potato-dextrose-água, PDA; carrot-dextrose-água, CDA; Czapek-água, CZA; bean-dextrose-água, BDA), three luminosity periods (continuous light-CL; continuous dark-CD; alternating light-AL), four combinations of carbon (dextrose, sucrose, maltose, xylose) and nitrogen (asparagine, arginine, peptone, potassium nitrate) sources on the physiological and morphological characteristics of *Colletotrichum gloeosporioides*. The experimental design was completely randomized with factorial arrangement and four replication/treatment. The mycelial growth was daily determined, the sporulation and morphological

characteristics after eight days of incubation. It was observed that CDA in CL and LA induced highest mycelial growth this media also induced the highest conidial productions when submitted to the three light conditions. In the C x N combinations where potassium nitrate was associated to sources of C it was propitiated the highest mycelial growth. The media containing sucrose or maltose as source of C and arginine as source of N induced the highest conidia production. In the morphologic characterization of the conidia, from the different culture media, light regimes and combinations of sources of C x N, the length and width averages obeyed the morphologic pattern of the studied species.

Key words: *Malpighia glabra*, *Colletotrichum gloeosporioides*, physiology, nutrition, morphology.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASENJO, C.F.; GÚSMAN, A.R. The high ascorbic acid content of the west indian cherry. *Science*, Washington, v.103, p.219, 1946.
2. CHATURVEDI, C. Nutritional studies on *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, Dordrecht, v.27, n.3/4, p.265-272, 1965.
3. COCHRANE, V.W. **Physiology of fungi**, New York: John Wiley & Sons, 1958. 542 p.
4. COX, M.L.; IRWIN, J.A.G. Conidium and appressorium variation in Australian isolates of the *Colletotrichum gloeosporioides* group and closely related species. *Australian System Botany*, v.1, p.139-149, 1988.
5. FERRAZ, J.F.P. Morfologia, comportamento cultural e patogenicidade de espécies de *Colletotrichum* e *Gloeosporium*. *Agronomia Lusitana*, Oeiras, v.38, n.2, p.163-179, 1977.
6. HAWKER, L.E. **The physiology of reproduction in fungi**. Cambridge: Cambridge University Press, 1959. 128 p.
7. HAWKER, L.E. Environmental influence on reproduction. In: AINSWORTH, G.C. & SUSSMAN, A.S. (Eds.). **The fungi**. New York: Academic Press, 1966. p.435-469.
8. LILLY, V.G.; BARNETT, H.L. **Physiology of the fungi**, New York: McGraw-Hill, 1951. 464 p.
9. OLIVEIRA, S.M.A.; MENEZES, M.; LARANJEIRA, D. Caracterização morfológica e cultural do *Colletotrichum gloeosporioides* em acerola (*Malpighia glabra* L.) no Estado de Pernambuco. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.19, p.293, 1994 (Suplemento).
10. SIEVERT, R.C. Effect of light on growth and sporulation of *Colletotrichum destructivum* in culture. *Phytopathology*, St. Paul, v.61, n.8, p.911, 1971.
11. SIMÃO, S. **Manual de fruticultura**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1971. p.477-485.
12. SUTTON, B.C. **The coelomycetes**. England: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696 p.
13. TANDON, R.N.; CHANDRA, S. The nutrition of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, Dordrecht, v.18, n.3, p.213-224, 1962.
14. TUITE, J. **Plant pathological methods fungi and bacteria**, Minnesota: Burgess, 1969. 239 p.
15. VON ARX, J.A. Die arten der gattung *Colletotrichum*. *Phytopathol. Z.*, v.29, p.413-469, 1957.