

Influência de meios de cultura sobre o crescimento, esporulação e peso seco de *Glomerella cingulata* agente da antracnose do limoeiro

Luciana Cordeiro do NASCIMENTO¹; Suzana Alencar Freire DANTAS¹; Maria MENEZES²; Sônia Maria Alves OLIVEIRA²

RESUMO: Foi estudado um isolado de *Glomerella cingulata* obtido de folhas de limoeiro quanto ao crescimento micelial, produção de esporos e peso seco em diferentes meios de cultura: batata-dextrose-água, cenoura-dextrose-água, aveia-dextrose-água e extrato de levedura-dextrose-água. Para determinação do peso seco, foram utilizados os mesmos meios sem a adição do água. Após o cultivo do material e identificação do patógeno em microscópio ótico, foram transferidos discos de micélio com 5mm de diâmetro, para placas de Petri ou Erlenmeyers contendo os diferentes meios de cultura. As culturas foram incubadas a 25±1°C e luz contínua com lâmpadas fluorescentes de 40 watts por um período de sete dias. Os fungos cultivados em meio líquido foram submetidos a agitação diária, permitindo uma maior oxigenação e distribuição dos nutrientes. Os resultados mostraram que no meio de cenoura-dextrose-água o *G. cingulata* apresentou maior velocidade de crescimento micelial. Em todos os substratos sólidos formaram proto peritécio, sendo que no meio de extrato de levedura-dextrose-água ocorreu a formação de peritécios e ascos com liberação de ascosporos. O maior peso seco de *G. cingulata* foi obtido nos meios líquidos aveia-dextrose e batata-dextrose.

Palavras chave: *Glomerella cingulata*, crescimento micelial, esporulação, peso seco, *Citrus limon*

INTRODUÇÃO

O limoeiro (*Citrus limon* (Linn) Burm.) está sujeito a um grande número de doenças que afetam as frutas tropicais e cítricas (Silveira *et al.*, 1998). Dentre as principais doenças, destaca-se a antracnose, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc., cujo telomorfo *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spaulding & Scherp é considerado um dos patógenos pós-colheita dos mais importantes, sendo responsável por perdas econômicas consideráveis (Maziero *et al.*, 1998; Buddie *et al.*, 1999).

A espécie *G. cingulata* pertence a divisão Amastigomycota, subdivisão Ascomycotina, classe Ascomycetes, família Polystigmataceae (Alexopoulos *et al.*, 1996). Caracteriza-se por apresentar peritécios isolados ou agrupados, rostrados ou globosos e ascosporos hialinos, unicelulares, curvos e produzidos em ascos clavados (Menezes & Oliveira, 1993). Os principais sintomas da doença quando associados a frutos previamente injuriados, são lesões deprimidas, firmes e secas, de cor marrom-escuro a preta, geralmente maiores que 1,5cm de diâmetro, podendo tomar grande área do fruto. Em condições de elevada umidade, massa de esporos de coloração rosa ou salmão são formadas na superfície das lesões. Contudo, quando a umidade é baixa, essa massa é de coloração marrom a preta, passando depois para marrom a cinza-escuro. Em ramos e folhas, as lesões somente aparecem após a morte de tecidos que apresentam infecções quiescentes, resultantes de invasões anteriores pelo fungo. As lesões são geralmente

deprimidas e apresentam frutificações típicas do fungo em acérvulos (Feichtenberger *et al.*, 1997).

O efeito de nutrientes específicos sobre o crescimento micelial, virulência e sobrevivência dos patógenos na biosfera tem sido estudado (Woltz; Jones, 1981), tornando-se uma importante ferramenta na demonstração dos elementos biologicamente essenciais. Fatores ambientais e nutricionais como luminosidade, umidade, aeração, pH, fontes de carbono, dentre outras, influenciam o crescimento e esporulação de um fungo (Cochrane, 1958).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência de quatro meios semi-sintéticos sobre o crescimento micelial, esporulação e peso seco de *G. cingulata*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do Isolado

Utilizou-se um isolado de *G. cingulata*, obtido de frutos de limão, apresentando sintomas característicos de antracnose. Fragmentos de lesões foram submetidos a desinfestação com álcool a 70%, hipoclorito de sódio a 1,5% e água destilada esterilizada (ADE). Em seguida, plaqueados em placas de Petri e incubados em condições de laboratório. Após o desenvolvimento da colônia do fungo, este foi repicado para tubos de ensaio para estudos posteriores.

Determinação do crescimento micelial

A partir da cultura pura de *G. cingulata*, transferiu-se discos do meio (5mm de diâmetro) para o centro de placas de Petri, contendo os meios de BDA (batata-dextrose-água), CDA

¹Doutorandas do PPGF-UFRPE

²UFRPE-DEPA/Fitossanidade, 52.171-900, Recife-PE

(cenoura-dextrose-ágar), ADA (aveia-dextrose-ágar) e LDA (extrato de levedura-dextrose-ágar). As culturas foram incubadas a uma temperatura de $25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ em regime de luz contínua, com lâmpadas fluorescentes de 40 watts, por sete dias.

A avaliação foi realizada diariamente, através de medição do diâmetro das colônias em sentido diametralmente opostos.

Determinação da esporulação

A produção de ascósporos foi estimada após a última leitura do crescimento micelial utilizando-se uma câmara de Neubauer. As suspensões de esporos foram obtidas pela adição de 20mL de ADE nas placas contendo o crescimento do patógeno, sendo filtrados em gaze de camada dupla esterilizada.

Determinação do peso seco

Os fungos foram cultivados nos meios sem a adição de ágar, submetidos a agitação diária, permitindo uma maior oxigenação e distribuição dos nutrientes, durante sete dias. Após este período, o material foi filtrado em meias de nylon e incubado em estufa a 50°C por 48 horas, sendo efetuadas as pesagens em balança digital.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De maneira geral, observou-se um melhor crescimento micelial de *G. cingulata* no meio CDA (88,67mm), mesmo não diferindo significativamente de LDA (83,00mm) e BDA (81,17mm). A maior velocidade de crescimento do fitopatógeno ocorreu no meio CDA (8,33 mm/h), bem como no LDA (6,30mm/h), conforme apresentado na Figura 1.

Foram observadas diferenças no comportamento de *G. cingulata* quando cultivados em diferentes meios de cultura. Parece ser aceito que um equilíbrio apropriado entre os constituintes do meio é muito importante para o crescimento micelial e esporulação dos fungos, e que existe uma grande variabilidade quanto a capacidade de crescimento entre os organismos (Davis *et al.*, 1992; Kuramae-Izioka *et al.*, 1997).

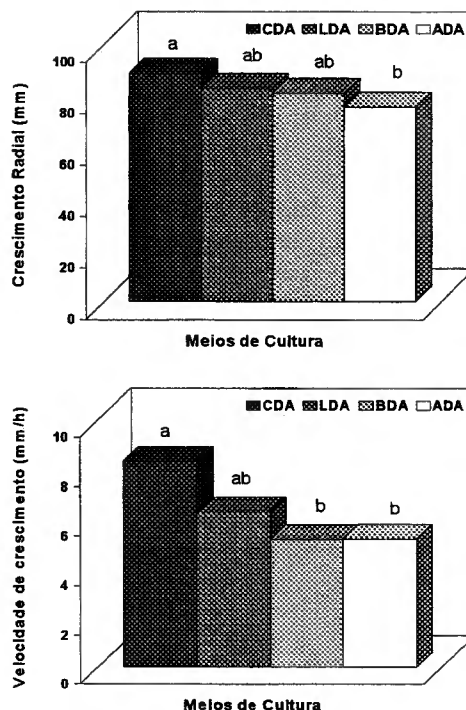


Figura 1 - Crescimento micelial e velocidade de crescimento de *Glomerella cingulata* em diferentes meios de cultura, avaliados sete dias após a incubação. Médias de três repetições. Colunas seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade

No meio CDA, o fungo apresentou um melhor crescimento, não diferindo do meio LDA e BDA. Uma melhor esporulação ocorreu no meio LDA (15×10^4 ascósporos/mL⁻¹), diferindo estatisticamente dos demais meios utilizados (Figura 2). O meio CDA foi o menos eficiente na esporulação do fungo ($1,6 \times 10^4$ ascósporos/mL⁻¹), mesmo tendo apresentado a maior velocidade de crescimento e maior crescimento radial de *G. cingulata*.

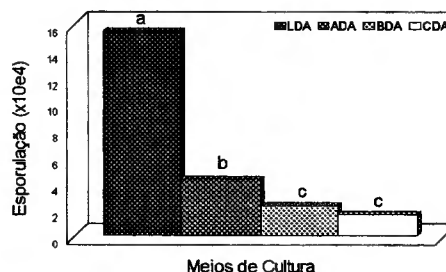


Figura 2 - Produção de esporos de *Glomerella cingulata* em diferentes meios de cultura, após sete dias de incubação. Médias de três repetições. Colunas seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

O CDA que mostrou-se eficiente em relação ao crescimento micelial, induziu uma baixa percentagem de ascósporos, demonstrando que o patógeno apresentou maiores índices de crescimento e esporulação em diferentes meios. Isto demonstra um comportamento diferenciado do patógeno quando as condições nutricionais não são semelhantes, concluindo-se que nem todos os meios são igualmente satisfatórios para o crescimento e esporulação (Mathur *et al.*, 1950; Lilly & Barnett, 1951; Cochrane, 1958; Griffin, 1994).

Com relação ao peso seco, os maiores índices foram obtidos nos meios AD ($12,2\text{g}\times 10^{-1}$) e BD ($11,88\text{g}\times 10^{-1}$), diferindo dos demais estatisticamente. O meio CD ($3,25\text{g}\times 10^{-1}$) foi significativamente superior quando comparado com LD ($1,38\text{g}\times 10^{-1}$) sem diferirem entre si (Figura 3).

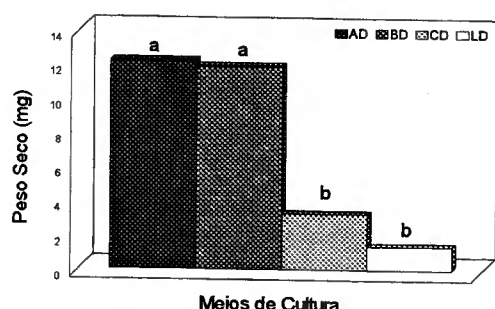


Figura 3 - Peso seco de *Glomerella cingulata*, após sete dias de incubação. Médias de três repetições. Colunas seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Observou-se uma relação inversamente proporcional entre esporulação e peso seco, quando as condições nutricionais foram idênticas, verificando-se claramente quando compara-se a Figura 2 com a Figura 3 no que se refere ao meio LDA que proporcionou maior esporulação e menor peso seco com relação aos demais meios utilizados. De acordo com Cochrane (1958), a limitação do peso seco para medir-se o crescimento de fungos, é que este pode refletir no acúmulo de polissacarídeos ou materiais de reserva, ao invés da síntese de novo protoplasma.

Os resultados evidenciaram que os meios de cultura influenciaram significativamente no crescimento micelial, esporulação e peso seco de *G. cingulata*, sendo este fator determinante para a avaliação destes parâmetros.

ABSTRACT

Influence of culture media on the growth, sporulation, and dry weight of *Glomerella cingulata*, agent antracnose of *Citrus limon*

It was studied an isolated of *Glomerella cingulata* obtained of lemon leaves with relationship to the micelial growth, production of spores and dry weight in different culture media: potato-dextrose-agar, carrot-dextrose-agar, oat-dextrose-agar and extract of yeast-dextrose-agar. For determination of the dry weight, the same media were used without the addition of the agar. After the cultivation of the material and pathogen identification in optic microscope, mycelium disks with 5mm of diameter were transferred, for plates of Petri or Erlenmeyers contends the different culture media. The cultures were incubated under $25\pm 10^{\circ}\text{C}$ and continuous light with fluorescent lamps of 40 watts for a period of seven days. The fungi cultivated in liquid media were submitted to daily agitation, allowing a larger oxygenation and distribution of the nutrients. The results showed that in the carrot-dextrose-agar media *G. cingulata* showed larger velocity of micelial growth. In all the solid substrata they formed proto perithecium, and in the extract of yeast-dextrose-agar it happened the perithecium and asci formation with ascospores liberation. The largest dry weight of *G. cingulata* was obtained in the liquid media oat-dextrose and potato-dextrose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. *Introductory mycology*. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. 868 p.
- BUDIE, A.G.; MARTINEZ-CULEBRAS, P.; BRIDGE, P.D.; GARCIA, M.D.; QUEROL, A.; CANNON, P.F.; MONTE, E. Molecular characterization of *Colletotrichum* strains derived from strawberry. *Mycology Research*, v.103, p. 385-394, 1999.
- COCHRANE, V.W. *Physiology of fungi*. New York: John Wiley & Sons, 1958. 524p.
- DAVIS, R.D.; BOLAND, R.M.; HOWITT, C.J. Colony descriptions, conidium morphology, and the effect of temperature on colony growth of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Styloanthus* spp. growing in several countries. *Mycology Research*, v. 96, p. 128-134, 1992.
- FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G.W.; GUIRADO, N. Doenças dos citrinos. In: KIMATI, H. *et al.* (Ed.). *Manual de Fitopatologia*. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2. p. 261-296.
- GRIFFIN, D.H. *Fungal physiology*. 2 ed. New York: Wiley-Liss, 1994. 458 p.
- KURAMAE-IZIOKA, E.E.; SOUZA, N.L.; MACHADO, M.A.; LOPES, C.R. Restriction endonuclease analysis of DNA of *Colletotrichum gloeosporioides* causing citrus post bloom fruit drop disease in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 22, p. 198-200, 1997.
- LILLY, V.G.; BARNETT, H.L. *Physiology of the fungi*. New York: McGraw-Hill Book Company, 1951. 464p.

9.

MATHUR, R.S.; BARNETT, H.L.; LILLY, V.G. Sporulation of *Colletotrichum lindemuthianum* in culture. **Phytopathology**, St. Paul, v.40, p.104-114, 1950.

10.

MAZIEIRO, J.M.N.; SOUZA, P.E. de; PEREIRA, R.T.G.; ITO, S.C.S. Efeito de fungicidas no controle da queda prematura de frutos jovens de citrus causado por *Colletotrichum gloeosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 257, 1998 (Suplemento).

11.

MENEZES, M.; OLIVEIRA, S.M.A. de. **Fungos fitopatogênicos**. Recife: UFRPE, 1993. 277p.

12.

SILVEIRA, N.S.S.; MARIANO, R.L.R.; OLIVEIRA, S.M.A. Fungos fitopatogênicos associados com frutos comercializados na cidade de Recife. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 297, 1998 (Suplemento).

13.

WOLTZ, S.S.; JONES, J.P. Nutritional requeriments of *Fusarium oxysporum*: basis for a disease. In: NELSON, P.E.; TOUSSON, T.A.; COOK, R.J. **Fusarium: diseases, biology and taxanomy**. Pensilvania: The Pensilvania State University Press, 1981. p. 340-350.