

Efeito de meio de cultura e regime luminoso no crescimento micelial de Mycosphaerellafragariae *Effect of medium and light regime on the mycelial growth of Mycosphaerellafragariae*

Cristina Fernanda Schneider e Márcia de Holanda Nozaki

Resumos: O fungo *Mycosphaerellafragariae*, agente causal da mancha das folhas em morangueiro, é considerada a principal doença da cultura. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o crescimento micelial de *Mycosphaerellafragariae* em diferentes regimes de luminosidade e meios de cultura. Para avaliar o crescimento em diferentes regimes de luminosidade, foram utilizados dois tratamentos: escuro e fotoperíodo alternado (12 horas claro/12 horas escuro); e para avaliar o crescimento em diferentes meios utilizou-se os meios: BDA, aveia-ágar, ágar-água, folha de morango-ágar e fruto de morango-ágar. Verificou-se que não ocorreu diferença significativa no crescimento nas diferentes condições de luminosidade; o crescimento foi maior nos meios: BDA, folha de morango-ágar, fruto de morango-ágar e aveia-ágar.

Palavras-chave: Mancha das folhas, morango, substrato, luz

Abstract -The *Mycosphaerellafragariae* fungus, causal agent of strawberry leaf spots, is considered the main disease of the culture. The aim for the present work was to evaluate the mycelial growth of *Mycosphaerellafragariae* in different regimes of light and culture media. To evaluate the growth under different luminosity conditions, two treatments were made: dark and alternate light (12 hours light/12 hours dark); and to evaluate growth under different media, it was used: PDA, oat-agar, water-agar, strawberry leaf-agar and strawberry fruit-agar. It was verified no significant difference on the growth under different luminosity conditions; and the growth was bigger on the PDA, strawberry leaf-agar and strawberry fruit –agar media.

Keywords: Leafspot, Strawberry, substratum, light

INTRODUÇÃO

A mancha-de-micosferela é a doença do morangueiro de ocorrência mais generalizada e pode ser encontrada em todas as regiões de cultivo. É causada por *Mycosphaerella fragariae* (Tul.) Lin., cuja forma assexual corresponde à *Ramularia tulasnei* Sacc. (MAZARRO et al., 2006).

Nas folhas mortas pela doença são formados esclerócios, sendo esta a principal forma de sobrevivência do fungo por longos períodos (MAZARO, 2007).

Os danos causados nas folhas reduzem sensivelmente a área fotossintética da planta (OLIVEIRA e SINIGAGLIA, 2002).

Um passo importante nos estudos sob condições controladas e em campo, nas áreas de Fitopatologia, Microbiologia, Melhoramento Vegetal, Biotecnologia, é o cultivo *in vitro* do organismo em estudo para produção massal de conídios vivos que serão utilizados durante as diferentes etapas de execução da pesquisa (LEÃO et al., 2012).

Para a reprodução de fungos *in vitro*, fatores favoráveis são requeridos, tanto nutricionais quanto ambientais. Dentre os fatores ambientais, estão

temperatura e luminosidade, importantes para o crescimento micelial e produção de esporos. Porém, nem sempre as condições que favorecem o crescimento são as mesmas para esporulação. A luz exerce efeito direto sobre o fungo, induzindo ou inibindo a formação de estruturas reprodutivas. Sabe-se ainda que, alguns meios de cultura são mais favoráveis para a esporulação de fungos que outros, por apresentarem carboidratos complexos que são menos adequados para a produção de hifas vegetativas, porém mais adequados à produção de esporos (NOZAKI et al., 2004).

Os fatores do ambiente determinam a distribuição geográfica, a incidência e a severidade da doença, sendo em muitos casos específicos para o patógeno em questão. Dentre esses fatores, a temperatura é a mais frequentemente correlacionada com a epidemiologia da doença, mas também a umidade e luz (ANDRADE et al., 2007).

Silva & Lemos (2012), verificaram que a melhor condição de incubação do fungo *Fusarium solani* visando a produção de conídios se dá pela associação do regime de luz contínua com os meios de cultura BDA (batata, dextrose, ágar) e BSA (batata, sacore, ágar).

Recebido em 24 02 2013 22 03 2013

1 doutoranda em Agronomia pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus Marechal Cândido Rondon <http://lattes.cnpq.br/7607558987155474> E-mail tina.schneider@hotmail.com

2 professora adjunto da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC/PR) <http://lattes.cnpq.br/4976846609735019>

Albuquerque et al. (2012), constataram que os meios de cultura contendo casca de amendoim e casca de mamona foram favoráveis para o rápido desenvolvimento do micélio de *Lentinus sajor caju* e *Pleurotus* spp.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento micelial do fungo *Mycosphaerellafragariae* em diferentes regimes de luminosidade e em diferentes meios de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do Isolado

Folhas sintomáticas de morango (*Fragaria x ananassa* Duch) foram coletadas em uma propriedade do município de Toledo, Paraná, das quais foram retirados pequenos fragmentos do tecido foliar doente com auxílio de lâmina de corte. Posteriormente, os fragmentos de foliáres foram submetidos a uma desinfecção prévia em solução de hipoclorito de sódio (3:1) por 3 minutos, seguida de Álcool 70% por 1 minuto, visando a remoção de patógenos superficiais. Em seguida, realizou-se a transferência, de forma asséptica, dos fragmentos foliáres para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA).

As placas de Petri foram mantidas em bancada, sob temperatura ambiente ($25 \pm 5^\circ\text{C}$) e luminosidade alternada (12 horas luz/12 horas escuro).

Crescimento micelial em diferentes condições de luminosidade

Para a verificação do crescimento micelial sob diferentes condições de luminosidade, foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos, sendo: escuro e fotoperíodo alternado (12 horas claro/12 horas escuro) e com cinco repetições.

Utilizou-se fragmentos de micélio de 5 mm de diâmetro de uma colônia do fungo desenvolvida em meio BDA durante 15 dias, os quais foram depositados no centro de placas de Petri contendo meio BDA. Os discos de colônia foram feitos com auxílio de um vazador de metal.

Para o tratamento escuro, as placas foram envoltas com papel alumínio, de forma que não recebessem qualquer tipo de iluminação. Enquanto que, no tratamento fotoperíodo alternado as placas foram dispostas sob uma bancada, sob temperatura ambiente ($25 \pm 5^\circ\text{C}$), onde permaneceram 12 horas no escuro e 12 horas no claro.

3 Crescimento Micelial em Diferentes Meios de Cultura

Para verificar a influência de diferentes meios de cultura sobre o crescimento micelial de *M. fragariae*, utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos, sendo os tratamentos diferentes meios de cultura, com as respectivas concentrações para cada litro de meio: BDA (200g de batata, 20g de dextrose, 20g de ágar); aveia-ágar (60g de aveia em flocos, 18g de ágar); ágar-água (20g de ágar); folha de morango-ágar (100g de folha de morangueiro, 20g de dextrose, 18g de ágar); fruto de morango-ágar (100g de frutos de morango, 20g de dextrose, 18g de ágar).

Fragmentos de micélio de 5 mm de diâmetro de uma colônia do fungo desenvolvida em meio BDA durante 15 dias, foram depositadas no centro de placas de Petri contendo seus respectivos meios de cultura.

As placas foram mantidas sob temperatura ambiente ($25 \pm 5^\circ\text{C}$), e regime de luminosidade alternada (12 horas claro/12 horas escuro).

Avaliações do Crescimento Micelial

As avaliações do crescimento micelial foram realizadas diariamente, onde foi realizada medição diametricamente oposta do crescimento da colônia do fungo em placa, com auxílio de uma régua graduada (cm), até que o crescimento de um dos isolados, em algum dos tratamentos, atingisse completamente as bordas da placa de Petri.

Delineamento experimental

Os resultados de crescimento micelial dos diferentes ensaios foram submetidos à análise de variância pelo teste de Tukey a um nível de 5% de probabilidade. Para o crescimento micelial em diferentes regimes de luminosidade, foi realizada análise de regressão.

Como instrumento estatístico utilizou-se o programa SISVAR (FERREIRA, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação ao crescimento micelial do fungo em diferentes regimes de luz, os resultados indicam que com relação ao fotoperíodo, o crescimento não foi estatisticamente significativo entre os dois tratamentos, igualmente para a interação fotoperíodo*horas. Entretanto, na variável horas obteve-se diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1 – Quadro de análise de variância dos tratamentos de diferentes regimes de luminosidade do fungo *Mycosphaerellafragariae*

Tratamentos	Quadrados Médios/Significância
Fotoperíodo	1.066667 n.s
Horas	416.142333 *
Fotoperíodo*Horas	1.879333 n.s
CV(%)	14.07
Média	4.496667

n.s = não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

* significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

Os resultados com relação ao fotoperíodo estão ilustrados estatística significativa entre os diferentes tratamentos de na Tabela 2, mostrando que não houve diferença fotoperíodo alternado e escuro.

Tabela 2 – Médias do crescimentomicelial de *Mycosphaerellafragariae* entre os dois tratamentos de regime de luminosidade pelo teste de Tukey, a 5% de significância

Tratamentos	<i>Mycosphaerellafragariae</i>
Alternado	4,363 a
Escuro	4,630 a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si significativamente, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

Diferente dos resultados obtidos por Montarroyos et al. (2007) os quais constataram que *Mycosphaerellamusicola* apresenta maior crescimento micelial em escuro e menor crescimento em claro contínuo, neste trabalho o crescimento foi estatisticamente igual nos tratamentos escuro e fotoperíodo alternado.

Casa et al. (2007) constataram que o crescimento micelial de *Stenocarpellamaydise S. macrospora* foi maior

sob o regime luminoso alternado e menor em regime luminoso de luz contínua, diferindo dos resultados observados no presente trabalho.

A Figura 1 nos mostra a análise de regressão, com comportamento linear com relação a variável horas, onde o crescimento micelial do fungo apresentou diferença estatística significativa no transcorrer das horas.

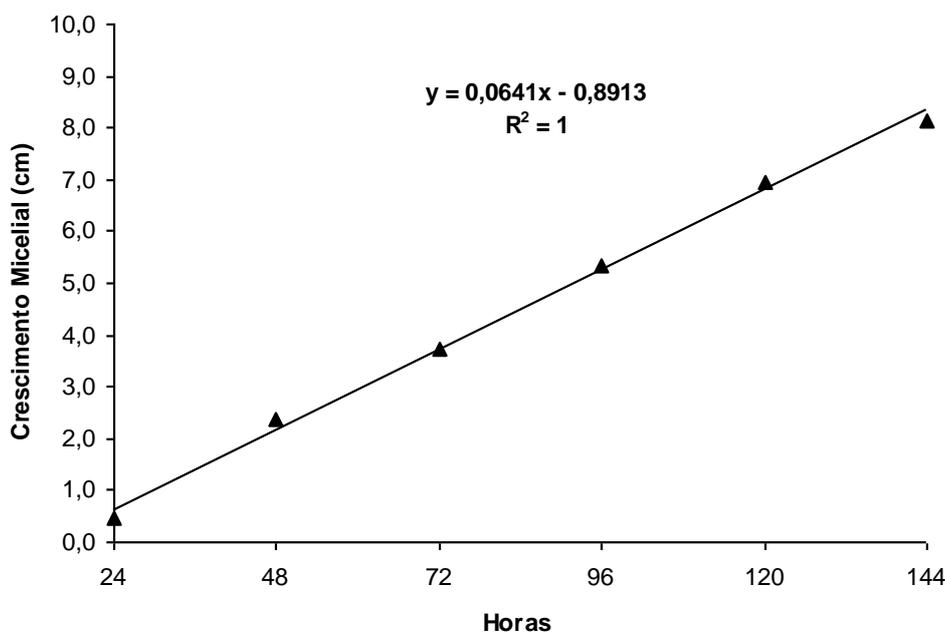


Figura 1 –Gráfico de regressão do crescimentomicelial (cm) de *Mycosphaerellafragariae* com relação aos diferentes períodos de avaliação

As avaliações encerraram-se aos sete dias após a implantação do ensaio, visto que, o fungo completou seu crescimento em toda a placa neste período, apresentando rápido desenvolvimento.

O crescimento micelial de *Mycosphaerellafragariae* nos diferentes meios de cultura: fruto de morango-ágar, aveia-ágar, ágar-água, folha de morango-ágar e BDA, encontram-se representados na Tabela 3.

Tabela 3 –Efeito dos diferentes meios de cultura no crescimento micelial (cm) de *Mycosphaerellafragariae*

Tratamentos	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	MÉDIA
Fruta	1,0 a	2,0 a	3,0b	4,2b c	5,8b	7,0b c	8,2b	4,4 a
Aveia	1,0 a	2,0 a	2,8a b	3,2b	5,6b	6,6b	7,6b	4,1 a
Ágar-água	1,0 a	2,0 a	2,4 a	3,4a b	4,4 a	5,4 a	6,4 a	3,5b
Folha	1,0 a	2,0 a	3,0b	4,4 c	6,0b	7,2b c	8,4b	4,5 a
BDA	1,0 a	2,0 a	3,0b	4,8 c	6,0b	7,6 c	8,6b	4,7 a
CV (%)	0,0	0,0	11,13	12,25	7,19	6,94	6,75	
Media	1,0	2,0	2,84	4,00	5,56	6,76	7,84	

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si significativamente, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

O fungo apresentou rápido desenvolvimento, completando seu crescimento em toda placa e finalizando a avaliação no período de sete dias.

Diferente das 24 e 96 horas de avaliação não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos. As avaliações realizadas a partir das 120 horas mostram diferença do crescimento micelial do fungo em meio ágar-água, sendo significativamente diferentes dos demais tratamentos, proporcionando menor crescimento do fungo até o término das avaliações.

Obteve-se resultados semelhantes neste trabalho, aos de Montarroyos et al. (2007), no qual obtiveram maior crescimento de *Mycosphaerella musicola* nos meios de cultura BDA, BDA/IFB (BDA acrescido de infuso de 200g de folhas de bananeira) e V8/IFB (V8 (200ml de suco vegetal V-8 da Campbell Soup Company, USA, 17g de ágar, 800ml de água destilada) acrescido de infuso de 200g de folhas de bananeira).

Entretanto, diferem dos resultados obtidos por Mello et al. (2004), os quais observaram que não houve diferença no crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* nos diferentes meios de cultura testados (BDA, aveia-ágar, extrato de pimentão filtrado e extrato de pimentão autoclavado).

Nozaki et al. (2004), constataram que *Diaporthe citri* apresenta maior crescimento micelial em meio aveia-ágar, o qual foi superior aos meios maltose-peptona-ágar, milho, folha de laranja e folha de limoneiro, sendo que os dados diferem deste trabalho, onde o meio BDA apresentou o maior crescimento.

Conclusão

1. Não existe diferença entre os tratamentos testados referentes à luminosidade.
2. O meio de cultura agar-água mostrou menor eficiência para a crescimento micelial de *Mycosphaerellafragariae* em comparação aos demais meios de cultura estudados.

AGRADECIMENTOS

A Pontifícia Universidade Católica do Paraná, campus Toledo.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, M.P.; PEIL, R.M.N.; NASCIMENTO, J.S. Crescimento micelial de *Lentinus sajor caju* (Fr.) Fr. e *Pleurotus* spp. Em diferentes resíduos agrícolas. **Bioscience Journal**. Uberlândia. v.28, n.5, p.895-902, 2012.
- ANDRADE, G.C.G.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G.; ZAUCA, E.A.V.; COUTO, M.M.F.; MAFFIA, L.A. Características culturais e severidade da mancha foliar de *Quambalariaeucalyptisob* diferentes regimes de temperatura, luz e período de molhamento foliar. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v.32, n.4, p.329-334, 2007.
- CASA, R.T.; REIS, E.M.; ZAMBOLIM, L.; MOREIRA, E.N. Efeito da temperatura e regimes de luz no crescimento do micélio, germinação de conídios e esporulação de *Stenocarpellamacrospora* e *stenocarpellamaydis*. **Fitopatologia Brasileira**. v.32, n.2, p. 137-142, 2007.
- FERREIRA, D.F. **Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows® versão 4.0**. Lavras: UFLA, 1999.
- LEÃO, E.U.; SANTOS, G.R.; SARMENTO, R.A.; REIS, M.R.; CHAGAS JÚNIOR A.F. Crescimento micelial e produção de conídios de *Ascochyta cucumis* em diferentes meios de cultura e regimes de luz. **Bioscience Journal**. Uberlândia, v.28, n.2, p.325-331, 2012.

- MAZARO, S.M. **Indução de resistência a doenças em morangueiro pelo uso de elicitores.** 2007. ex. 87p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- MAZARO, S.M.; GOUVEA, A.; DE MIO, L.L.M.; DESCHAMPS, C.; BIASI, L.A.; CITADIN, I. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha-de-micosferela em morangueiro. **Ciência Rural.** Santa Maria, v.36, n.2, p.2527-2530, 2006.
- MELLO, A.F.S.; MACHADO, A.C.Z.; BEBENDO, I.P. Desenvolvimento de *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de pimentão em diferentes meios de cultura, temperatura e regimes de luz. **Scientia Agricola.** Piracicaba, Brasil. v.61, n.5, p.542-544, 2004.
- MONTARROYOS, A.V.V.; COELHO, R.S.B.; FERRAZ, G.M.G.; SANTOS, R.; SANTOS, V.F.; ANDRADE, P.P. Efeitos de meio de cultura, fontes de carbono e nitrogênio, pH e regime luminoso no crescimento micelial de *Mycosphaerella musicola*. **Summa Phytopathology.** Botucatu, v.33, n.1, p.86-89, 2007.
- NOZAKI, M.H.; CAMARGO, M.; BARRETO, M. Caracterização de *Diaporthe citri*, em diferentes meios de cultura, condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira.** v.29, n.4, p.429-432, 2004.
- OLIVEIRA, S.H.F.; SINIGAGLIA, C. Manejo das doenças do morango. In: **Anais da VII Reunião itinerante de fitossanidade do instituto Biológico.** p.95-105. Indaiatuba-SP. 2002.
- SILVA, J.L.; TEIXEIRA, R.N.V. Esporulação e crescimento micelial de *Fusarium solani* em diferentes meio de cultura e regimes de luminosidade. **Revista Agroambiente On-line.** V.6, n.1, p.47-52, 2012.