

CRESCIMENTO MICELIAL E PRODUÇÃO DE CONÍDIOS DE *Ascochyta cucumis* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E REGIMES DE LUZ

MYCELIAL GROWTH AND CONIDIAL PRODUCTION OF *Ascochyta cucumis* IN DIFFERENT CULTURE MEDIA AND LIGHT REGIMEN

Evelynne Urzêdo LEÃO¹; Gil Rodrigues dos SANTOS²; Renato Almeida SARMENTO²; Marcelo Rodrigues dos REIS³; Aloísio Freitas CHAGAS JÚNIOR²

1. Engenheira Agrônoma, Mestre em Produção Vegetal, Universidade Federal do Tocantins - UFT, Gurupi, TO, Brasil. evelynnepi@hotmail.com; 2. Professor, Doutor, UFT, Campus de Gurupi, TO, Brasil. gilrsan@uft.edu.br; 3. Professor, Doutor, Universidade Federal de Viçosa – UFV, Campus de Rio Paranaíba, MG, Brasil.

RESUMO: A planta da melancia pode ser infectada por diversos patógenos que podem provocar perdas na produtividade e qualidade dos frutos. Entre estes, o fungo *Ascochyta cucumis*, que é o agente causal do crestamento gomoso do caule em plantas de melancia pode ser considerado um grande problema. Para estudos de laboratório e de campo é importante ter um crescimento e esporulação abundante do patógeno em estudo. No entanto, estudos sobre a esporulação de *A. cucumis* em diferentes meios de cultura são escassos na literatura nacional e internacional. O objetivo deste trabalho foi estudar a influência de diferentes meios de cultura e do regime de luz no crescimento micelial e produção de conídios de *A. cucumis*. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 7 x 3, com cinco repetições. Os meios testados foram: BDA; BDA modificado; V8 modificado; aveia; cenoura; folha de melancia e folha de melancia+CaCO₃. Todos os meios foram submetidos à luz contínua, fotoperíodo 12 hr e escuro contínuo. Os meios que mais favoreceram o crescimento micelial foram folha de melancia + CaCO₃, folha de melancia e BDA modificado, respectivamente, sob regime de luz contínua. Maior produção média de conídios foi obtida nos meios folha de melancia e folha de melancia+CaCO₃. O meio folha de melancia+CaCO₃ foi o que mais favoreceu a produção de conídios mesmo em diferentes regimes de luz.

PALAVRAS – CHAVE: *Didymella bryoniae*. Fotoperíodo. Substrato. Multiplicação.

INTRODUÇÃO

A planta de melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb) Mansf) pode ser infectada por diversos patógenos que podem provocar perdas na produtividade e na qualidade dos frutos. Dentre os patógenos que infectam a planta, o fungo *Ascochyta cucumis* Fautr & Roum (teleomórfo *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm), agente causal do crestamento gomoso do caule da melancia é um dos mais importantes nas condições brasileiras (SANTOS et al., 2005).

A doença pode ocorrer durante todo o ciclo, desde a fase de plântula até o período de formação de frutos, podendo causar tombamento, lesões circulares nos cotilédones e folhas e formação de cancos no caule e nas hastes (SANTOS et al., 2005). Em estágios mais avançados da doença é possível observar pequenas pontuações escuras e circulares que correspondem aos picnídios do patógeno, juntamente com exsudado gomoso associado às lesões (KUROZAWA et al., 2005). Temperaturas de 20 a 30 °C, com um ótimo em torno de 25 °C e umidade relativa do ar em torno de 95% são favoráveis ao desenvolvimento do fungo no hospedeiro. Porém, a doença pode ocorrer em locais onde a umidade é inferior a 40% durante o dia

e há molhamento foliar à noite (SANTOS et al., 2005). Para o controle recomenda-se a adoção de técnicas de manejo integrado, incluindo práticas culturais, controle químico e controle genético com a utilização de genótipos tolerantes e/ou resistentes dentre outras medidas (SANTOS et al., 2011).

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. Segundo Salles (2002), *A. cucumis* é de difícil crescimento e esporulação em meio de cultura, pois apresenta crescimento micelial lento em relação aos contaminantes. Entretanto, o uso de *Nalgene autoclavable pan* mostrou-se mais favorável a esporulação do que o crescimento tradicional em placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA) (GUSMINI et al., 2003). Alguns autores obtiveram esporulação de *A. cucumis* com diversos meios como: meio BDA modificado, com 50g batata/L de água (SOMAI et al., 2002), feijão Azuki (PASCHOLATI et al., 1986), cubos de batata autoclavados (NGA et al., 2010), meio V8 Juice-Ágar cultivado sob luz ultravioleta curta contínua

Crescimento micelial...

(TSUTSUMI, 2004) e meio BDA sob luz ultravioleta contínua (TSAY et al., 1990).

Fatores importantes como a composição e concentração de nutrientes no meio, requerimento nutricional e a variabilidade fisiológica do isolado, além das condições ambientais, podem influenciar a multiplicação de conídios de fungos fitopatogênicos (CRUZ et al., 2009). Desta forma, é importante determinar os melhores meios de cultivo e condições de luminosidade para que se obtenha uma alta produção de conídios em um curto período de tempo. Este trabalho teve por objetivo estudar a influência de diferentes meios de cultura e do regime de luz no crescimento micelial e produção de conídios de *A. cucumis*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Tocantins (UFT), Campus Universitário de Gurupi – TO, e repetido para confirmação dos resultados.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 7 x 3, com cinco repetições, sendo os fatores representados por meios de cultura e regimes de luz. Os meios testados foram: BDA (250g batata, 20g dextrose, 15g Ágar); BDAM - BDA modificado (50g batata, 20g dextrose, 15g Ágar) (SOMAI et al., 2002); V8M - V8 modificado (230g de suco de tomate concentrado, 20g dextrose, 15g Ágar e 3g CaCO₃) (DIAS NETO et al., 2010); MA - meio aveia (50g Aveia em Flocos Quaker®, 20g dextrose, 15g Ágar); MC - meio cenoura (300g de cenoura, 20g dextrose, 15g Ágar); FM - folha de melancia (80g folha de melancia picada, 16g de Ágar) e FM+CaCO₃ - folha de melancia + CaCO₃ (80g folha de melancia picada, 16g de Ágar, 3g de CaCO₃) adaptados de Brunelli et al., (2006). Para o preparo dos meios, os reagentes utilizados foram: Ágar-Ágar granulado (puro, purificado e livre de inibidores microbiológicos com pH inferior a 6,0); Dextrose (D[+] glucose anidra C₆H₁₂O₆); adicionado de 250g de Ampicilina.

Após a autoclavagem durante 20 minutos a 120 °C, os meios foram vertidos, aproximadamente 20 mL, em placas de Petri sob condições assépticas. O isolado de *A. cucumis* (Melancia UFT – 39), obtido de cultivo de melancia em Gurupi-TO, foi repicado por disco micelial e posicionado no centro de cada placa. As placas foram submetidas aos seguintes regimes de luz: LC - Luz contínua e FP-12 Fotoperíodo (12 horas de luz) e EC - Escuro Contínuo, e incubadas por 10 dias em câmara de

crescimento à temperatura de ±27 °C. No tratamento de regime de LC e FP-12 as placas ficaram posicionadas 20 cm abaixo de lâmpadas de luz fluorescente, luz do dia, 40W (Universal Duramax) e em EC as placas foram envoltas em papel alumínio.

O diâmetro da colônia (mm) foi quantificado aos sete dias com o auxílio de um paquímetro digital, e a avaliação do número de conídios ($n^{\circ} \times 10^4$ conídios.mL⁻¹) foi realizada aos 10 dias após a repicagem. Para contagem dos conídios, cada placa foi lavada com 20 mL de água destilada estéril e foi feita a raspagem com auxílio de um pincel de cerdas macias para a liberação dos conídios dos picnídios. Após a lavagem, a solução foi filtrada em gaze e os conídios foram quantificados em câmara de Neubauer.

Para a análise estatística, os dados foram tabulados e submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora haja relatos que o crescimento micelial de *A. cucumis* é relativamente lento se comparado a outros fungos (SALLES, 2000), no presente trabalho isso não se verificou. Com sete a oito dias após a repicagem toda a superfície do meio de cultura foi ocupada pelo fungo, na maioria dos meios de cultura. Observou-se ainda crescimento em todos os meios utilizados, independente do regime de luz, diferindo apenas na velocidade de crescimento e na aparência do micélio (Figura 1).

De acordo com os resultados obtidos verificou-se que o maior crescimento micelial (Tabela 1) de *A. cucumis* foi proporcionado pelos meios de cultura de FM, BDAM e FM + CaCO₃, respectivamente, sob regime de LC. E o meio V8M foi o que proporcionou menor crescimento. Os meios MA, MC e BDA não diferiram dos demais. No regime de FP-12 não houve diferença estatística entre os tratamentos. E no regime de EC o meio contendo FM+CaCO₃ proporcionou maior crescimento micelial, diferindo apenas do meio BDA.

De um modo geral, não houve diferença estatística significativa entre a maioria dos regimes de luz utilizados para o crescimento micelial de *A. cucumis*. Entretanto, o meio V8M proporcionou maior diâmetro médio da colônia quando submetido ao regime de EC (76,8 mm), e menor diâmetro médio quando submetido ao regime de LC (61,9 mm).

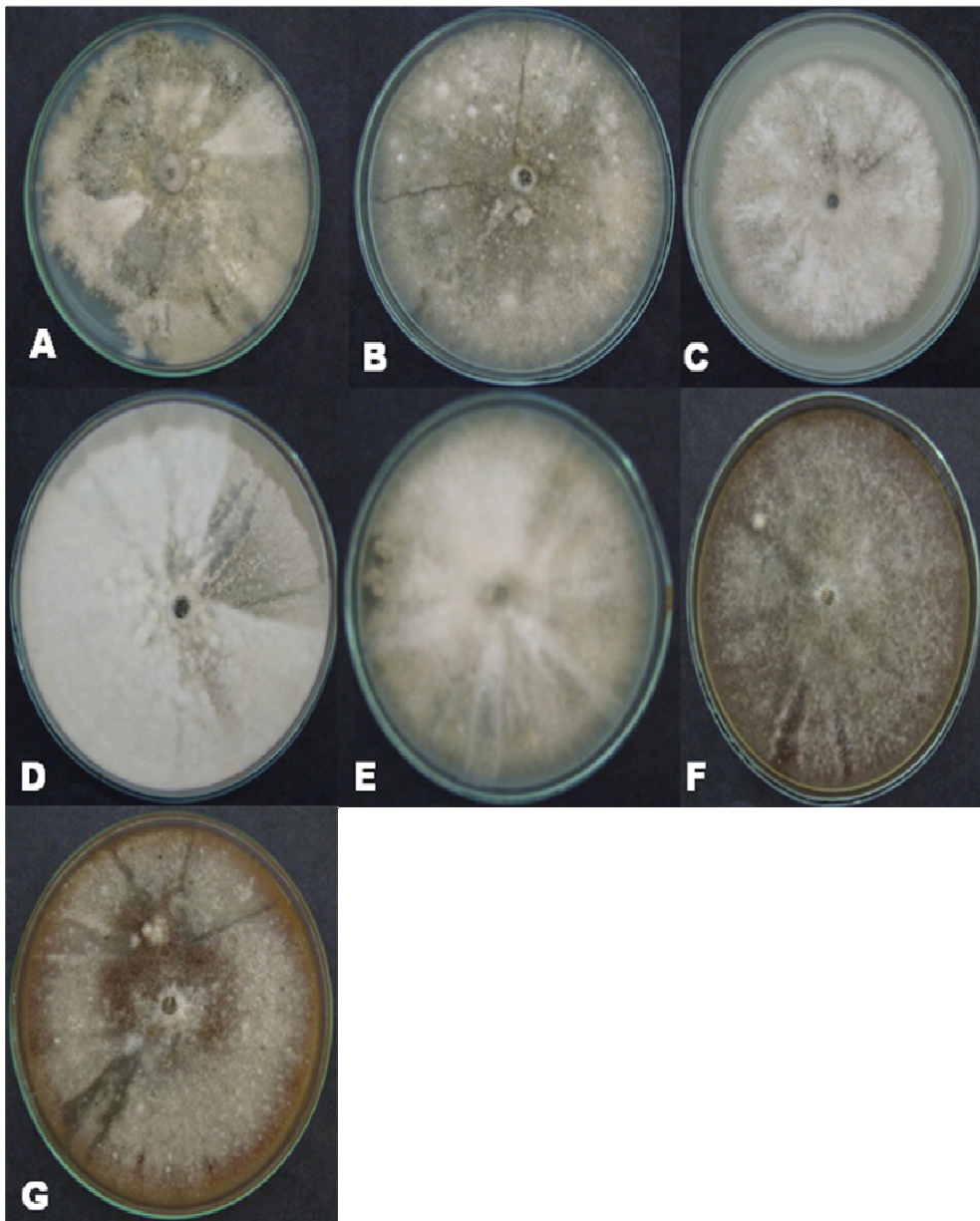


Figura 1. Aspecto da colônia de *Ascochyta cucumis*, após sete dias da repicagem nos meios de cultura BDA (A), BDA modificado (B), V8 modificado (C), Meio Aveia (D), Meio Cenoura (E), Meio folha de melancia (F) e Meio folha de melancia + CaCO_3 (G).

Tabela 1. Diâmetro médio da colônia (mm) de *Ascochyta cucumis* obtidos em diferentes meios de cultura e regimes de luz, após sete dias de incubação. Gurupi. UFT, 2010.

Meio de Cultura ¹	Diâmetro médio da colônia fúngica (mm) ³		
	LC ²	FP-12	EC
BDA	69,1 abA	74,0 aA	61,1Ba
BDAM	80,2 aA	70,5 aA	74,7 abA
V8M	61,9 bB	72,2 aAB	76,8 abA
MA	73,2 abA	69,5 aA	77,2 abA
MC	71,4 abA	65,6 aA	65,2 abA
FM	81,5 aA	71,1 aA	77,0 abA
FM+CaCO ₃	80,1 aA	71,2 aA	80,9 aA
Médias	73,9 A	70,6 A	73,3 A
CV(%)		12,88	

¹Meios de cultura: BDA; BDAM – BDA modificado; V8M – V8 modificado; MA – meio aveia; MC – meio cenoura; FM – folha de melancia e FM+CaCO₃ – folha de melancia + CaCO₃; ²Regimes de Luz: Luz contínua (LC); Fotoperíodo 12 h (FP-12) e Escuro contínuo (EC); ³Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, e maiúscula na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

Com relação à produção de conídios, de acordo com os resultados obtidos (Tabela 2), verificou-se que quando submetidos ao regime de LC, os meios de cultura FM+CaCO₃ seguido de FM, proporcionaram maiores concentrações, e

foram estatisticamente superiores aos demais (Figura 2), produzindo respectivamente 17,84 e 14,41 x 10⁴ conídios.mL⁻¹. Porém, estes não mostraram diferenças significativas entre si.

Tabela 2. Concentração de conídios de *Ascochyta cucumis* obtidos em diferentes meios de cultura e regimes de luz, após dez dias de incubação. Gurupi. UFT, 2010.

Meio de Cultura ¹	Concentração de conídios (n° x 10 ⁴ conídios.mL ⁻¹) ³		
	LC ²	FP-12	EC
BDA	0,19dA	0,25 bcA	0,09 bA
BDAM	2,26 cA	0,22 bcB	0,05 bB
V8M	0,23dB	2,48 aA	0,56 bB
MA	0,03 dA	0,08 cA	0,03 bA
MC	0,17 dA	0,69 bcA	0,27 bA
FM	14,41 bA	1,67 abB	0,54 bB
FM+CaCO ₃	17,84 aA	2,56 aB	3,70 aB
Medias	5,02 A	1,14 B	0,75 B
CV(%)		34,26	

¹Meios de cultura: BDA; BDAM – BDA modificado; V8M – V8 modificado; MA – meio aveia; MC – meio cenoura; FM – folha de melancia e FM+ CaCO₃ – folha de melancia + CaCO₃; ²Regimes de Luz: Luz contínua (LC); Fotoperíodo 12 h (FP-12) e Escuro contínuo (EC); ³Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, e maiúscula na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

Sob o regime de FP-12 o fungo apresentou baixa concentração de conídios, sendo os meios FM+CaCO₃ e V8M os que proporcionaram maiores médias de conídios por mililitro, obtendo uma concentração de 2,56 e 2,48 x 10⁴ conídios.mL⁻¹ respectivamente, sendo estes diferentes estatisticamente dos demais meios utilizados. Dias Neto et al. (2010) obtiveram resultados satisfatórios utilizando o meio V8M na produção de conídios de *Magnaporthe grisea*. Brunelli et al. (2006), trabalhando *Cercospora zea-maydi* também obtiveram produção de conídios utilizando o meio V8.

Em regime de EC, o meio FM+CaCO₃ proporcionou diferença estatística significativa na concentração de conídios (3,7 x 10⁴ conídios.mL⁻¹) diferindo dos demais. Sendo FM+CaCO₃ o meio de cultura que mais favoreceu a produção de conídios do fungo, mesmo em diferentes regimes de luz.

A luminosidade e o meio de cultura foram fatores fundamentais na produção de conídios de *A. cucumis*, uma vez que o regime de LC favoreceu a maior produção média de conídios na maioria dos meios, sendo as menores médias observadas no regime de EC que, no entanto, não diferiu estatisticamente do regime de FP-12.

Em média, os meios FM+CaCO₃ e FM proporcionaram maiores números de conídios (Figura 2), confirmando a observação feita por Tuite (1969), Satyanarayana e Sadasiva Reddy (1986). Estes autores afirmaram que os meios preparados a

partir de partes de plantas suscetíveis podem aumentar a possibilidade de esporulação. Entretanto, Chagas et al., (2009) relataram que os meios a base de folhas de mamona não se mostraram eficientes para a produção de conídios de *Botryotinia ricini*, quando comparados com os meios V8- 20% e BDA. Somai et al. (2002), conseguiram esporulação de *D. bryoniae* ao utilizarem meio onde se usou 50g batata/L de água. Segundo estes, houve maior esporulação devido à simplicidade do meio citado. Resultado semelhante foi obtido neste trabalho, onde o meio BDAM proporcionou produção de conídios que, no entanto, foi considerada baixa (2,26 x 10⁴ conídios/mL). Os meios que proporcionaram menor produção média de conídios foram o MA, BDA e MC, produzindo respectivamente 0,05, 0,18 e 0,38 x 10⁴ conídios.mL⁻¹ (Figura 2).

O maior estímulo à produção de conídios de *A. cucumis* sob luz contínua pode estar relacionada ao estresse propiciado pela intensa luminosidade constante, uma vez que nesta condição, poderia provocar um maior ressecamento do meio de cultivo, induzindo o fungo a gerar um número maior de descendentes (CRUZ et al., 2009), ou pode estar relacionado à provável influência da luz na síntese de compostos essenciais à esporulação, ausentes no meio de cultura (DEL PELOSO et al., 1989). Hanada et al. (2002), relataram que a luminosidade foi fator fundamental na esporulação de

Mycosphaerella fijiensis, uma vez que sob o regime

de escuro contínuo o fungo não esporulou.

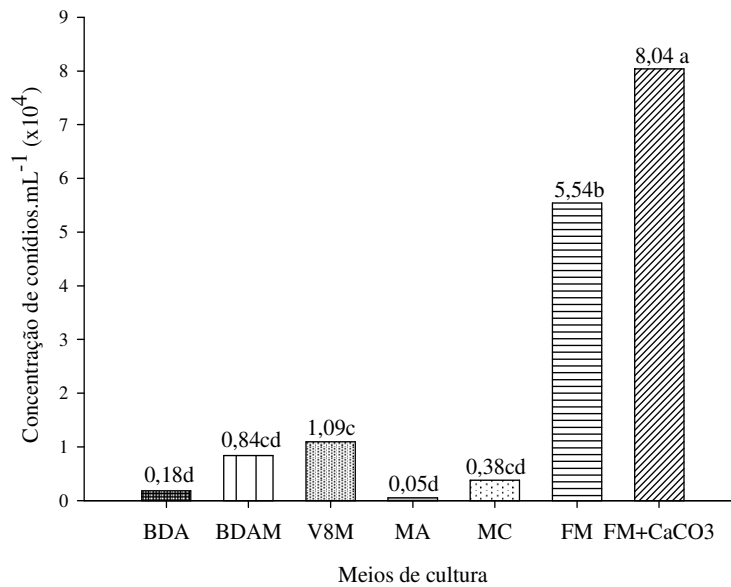


Figura 2. Médias da concentração de conídios de *A. cucumis* aos dez dias após a repicagem, sob diferentes meios de cultura. BDA; BDAM - BDA modificado; V8M- V8 modificado; MA - meio aveia; MC - meio cenoura; FM - meio folha de melancia e FM+ CaCO₃ - meio folha de melancia + CaCO₃.

CONCLUSÕES

Os meios de cultura folha de melancia e folha de melancia+CaCO₃ proporcionaram a maior produção média de conídios e crescimento micelial de *A. cucumis*.

O regime de luz não influenciou no crescimento micelial de *A. cucumis*, porém a luz contínua estimulou à maior produção de conídios.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro do CNPq pela bolsa de mestrado do primeiro autor (Processo n° 552 756/2009-1) e pela bolsa de produtividade do segundo autor.

ABSTRACT: Watermelon plants can be infected by different pathogens that can cause losses in yield and fruit quality. Among these, the fungus *Ascochyta cucumis*, which is the causal agent of gummy stem blight in watermelon plants can be considered the major problem. To laboratory and field studies it is important to have an abundant growth and sporulation of the studied pathogen. However, studies on the sporulation of *A. cucumis* at different culture media are scarce in the national and international literature. Thus, the objective of this work was to study the effect of different culture media and the light regimens on the mycelial growth and conidial production of *A. cucumis*. The experiments were performed in a completely randomized design in a factorial 3 x 7, with five replicates. The media tested were the following: BDA, modified BDA, modified V8, oatmeal, carrot, watermelon leaf and watermelon leaf + CaCO₃. All media were submitted to continuous light, 12 hr photoperiod and continuous darkness. The media that most favored the mycelial growth were the watermelon leaf + CaCO₃, watermelon leaf and modified BDA under continuous light regimen. Increased average production of conidia was afforded by watermelon leaf media and watermelon leaf + CaCO₃ media. The watermelon leaf + CaCO₃ media was the one that most favored the production of conidia, even at different levels of light regimens.

KEYWORDS: *Didymella bryoniae*. Photoperiod. Substrate. Multiplication.

REFERÊNCIAS

BRUNELLI, K. R.; FAZZA, A C.; ATHAYDE SOBRINHO, C.; CAMARGO, L. E. A. Efeito do meio de cultura e do regime de luz na esporulação de *Cercospora zae-maydis*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 92-94, jan/mar. 2006.

- CHAGAS, H. A.; ROSA, D. D.; BASSETO, M. A.; ZANOTTO, M. D.; FURTADO, E. L. Esporulação de *Botryotinia ricini* em diferentes meios de cultura. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, n. 5, p. 120-123, set./out. 2009.
- DEL PELOSO, M. C., FERNANDES, C. D., FIGUEIRAS, A. T.; CHAVES, G. M. Esporulação de *Cercospora coffeicola* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, p. 41-44. 1989.
- CRUZ, M. F. A.; PRESTES, A. M.; MACIEL, J. L. N. Esporulação de *Pyricularia grisea* em diferentes meios de cultura e regimes de luz. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1562-1564, ago. 2009.
- DIAS NETO, J. J.; SANTOS, G. R.; CASTRO NETO, M. D; ANJOS, L. M.; CUNHA, A. C. F.; IGNÁCIO, M. Influência do meio de cultura na esporulação de *Magnaporthe grisea* e da concentração de conídios na severidade da brusone do arroz. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, p. 173-179. mar./abr. 2010.
- GUSMINI, G.; ELLINGTON, T. L.; WEHNER, T. C. Mass production of gummy stem blight spores for resistance screening. **Cucurbit Genetics Cooperative Report**, v. 26, p. 26-30. mai. 2003.
- HANADA, R. E.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 170-173, mar/abr. 2002.
- KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A.; REZENDE, J. A. M. Doenças das cucurbitáceas In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 2005. p. 293-310.
- NGA, N. T.; GIAU, N. T.; LONG, N. T.; LÜBECK, M.; SHETTY, N. P.; NEERGAARD, E.; THUY, T. T.; KIM, P. V.; JORGENSEN, H. J. Rhizobacterially induced protection of watermelon against *Didymella bryoniae*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 567-82, ago. 2010.
- PASCHOLATI, S. F.; MORAES, W. B. C.; FIGUEIREDO, M. B.; OLIVEIRA, A. R. Induced protection in melon plants against *Mycosphaerella melonis* by prior inoculations with *Helminthosporium carbonum* or heat-inactivated *M. melonis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, n. 3, p. 507-514. out. 1986.
- SALLES, M. A. **Reação de genótipos de melão e porta-enxertos ao oídio e/ou ao cancro-da-haste e na compatibilidade da enxertia**. 2002. 38f. Monografia (Trabalho de Graduação em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.
- SANTOS, G. R.; LEÃO, E. U.; CASTRO, H. G.; NASCIMENTO, I. R.; SARMENTO, R. A.; SARMENTO-BRUM, R. B. C. Crestamento gomoso do caule da melancia: Etiologia, epidemiologia e medidas de controle. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 2, n. 2, p. 52-58. mai. 2011.
- SANTOS G. R.; ZAMBOLIM L.; RESENDE J. A. M.; COSTA H. **Manejo Integrado de Doenças da Melancia**. Viçosa: Ed. UFV, 2005. 70 p.
- SATYANARAYANA, K.; SADASIIVA REDDY, C. A new and cheap medium supporting the sporulation of *Pyricularia oryzae*. **Indian Journal Mycological Plant Pathology**, v. 163, n. 3, p. 329-330, 1986.
- SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA, Anais... Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. p. 393-396.
- SOMAI, B. M.; KEINATH, A. P.; DEAN, R. A. Development of PCRELISA for detection and differentiation of *Didymella bryoniae* from related *Phoma* species. **Plant Disease**, v. 86, p. 710-716. jul. 2002.

TSAY, J. G.; TZEN, S. L.; AND TUNG, B. K. Enhancement of sporulation of *Didymella bryoniae* by near-ultraviolet radiation. **Journal Plant Protection Bulletin** (Taipei), v. 32, n.3, p. 229-232, 1990.

TSUTSUMI, C. Y.; SILVA, N. Screening of melon populations for resistance to *Didymella bryoniae* in greenhouse and plastic tunnel conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 2, p. 171-177, jun. 2004.

TUITE, J. **Plant Pathological Methods, Fungi and Bacteria**. Minneapolis: Burgess Publishing Company, Minneapolis. 1969. 239p.