

CRESCIMENTO MICELIAL DE RAÇAS DE *Colletotrichum lindemuthianum* SOB DIFERENTES POTENCIAIS HÍDRICOS

MICELIAL GROWTH OF RACES OF *Colletotrichum lindemuthianum* UNDER WATER POTENTIALS

REY, Maristela dos S.¹.; LIMA, Nelson B.³; SANTOS, Juliano dos²; FARIAS, Candida R. J. de¹; PIEROBOM, Carlos R.⁴.

RESUMO

A restrição hídrica baseia-se em modificar o potencial osmótico de meios de cultura ou substratos utilizando solutos osmóticos. É uma técnica que vem sendo testada como método de evitar a germinação de sementes em testes de sanidade sem afetar a detecção de fungos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento micelial das raças, 31 (κ) e 1673 e 2047 do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose, doença que causa grandes danos na cultura do feijoeiro. Em meio de cultura Mathur, os solutos utilizados para modificar o potencial hídrico foram sacarose e NaCl, nos potenciais osmóticos - 0,6 e - 0,8 MPa e -1,0 MPa. A quantidade de soluto utilizada para atingir os níveis de restrição hídrica foi calculada pelo "software SPMM - Solute potencial and molar-molar-g water conversion". O fungo foi retirado das placas de Petri contendo o fungo e posto para incubação sob temperatura de $\pm 22^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12 horas. Os resultados mostraram que ocorreu uma variação no comportamento das raças de *C. lindemuthianum* com relação aos potenciais osmóticos e aos solutos utilizados. A raça 31 desenvolveu-se negativamente com o uso da restrição osmótica, tendo crescimento reduzido em todos os potenciais com relação a testemunha. Quanto ao 1673, o crescimento radial foi máximo nos potenciais de - 0,6 e - 0,8 MPa utilizando sacarose como restritor, diferenciando positivamente da testemunha. O patótipo 2047 obteve crescimento máximo no potencial - 0,6 tanto com NaCl como Sacarose.

Palavras-chave: restrição hídrica, potencial osmótico, patótipo.

INTRODUÇÃO

O potencial hídrico pode ser explicado pela diferença entre o potencial químico da água em um sistema, ou parte desse sistema, e o potencial químico da água livre, em condições iguais de temperatura e pressão atmosférica (DUNIWAY, 1979). O estudo do comportamento de organismos fitopatogênicos em substrato agarizado, modificado osmoticamente tem sido de grande interesse, tanto em testes de inoculação de fungos em sementes (CARVALHO, 1999), como em testes de sanidade (COUTINHO, 2000 e FARIAS et al. 2003). A restrição osmótica pode modificar o desenvolvimento normal de patógenos em seus hospedeiros (COOK & PAPENDICK, 1978). Testes foram realizados e mostraram comportamento diferenciado de fungos em substrato com potencial osmótico modificado (SOMERS et al., 1970; ADEBAYO & HARRIS, 1971; WEARING & BURGESS, 1979; SUBBARAO, MICHAILIDES & HARRIS, 1993; GAO & SHAIN, 1995; ALAM, JOICE & WEARING, 1996, citados por COUTINHO, 2000).

Portanto, o estudo do desenvolvimento de fungos fitopatogênicos em relação às suas exigências hídricas, pode auxiliar o desenvolvimento de tecnologias que venham favorecer o controle de doenças relacionadas com esses patógenos (CARVALHO, et al. 2001).

Fungos como *Phytophthora cinnamomi* Rands, *Phytophthora parasitica* Dast. e *Phytophthora megasperma* Drechler var. *sojae* Hild, tiveram seu crescimento micelial alterado com a adição de solutos iônicos (KCl e mistura dos sais NaCl, KCl e Na_2SO_4) em meios de cultura. Os potenciais osmóticos de - 1 e -1,5 MPa, estimularam o crescimento de micelial de *P. megasperma*, potenciais mais negativos que -1 reduziram seu crescimento vegetativo (SOMMERS et al., 1970).

O crescimento vegetativo de fungos como *Botrytis cinerea* Pers. e *Alternaria alternata* (Fr) Keissler (ALAM et al., 1996), *Fusarium roseum* "graminearum" J. Sheld (WEARING & BURGESS, 1979), *Ascochyta paspali* Lib. (MORLEY et al., 1993) é estimulado usando um potencial osmótico entre zero e -2 MPa. O diâmetro das colônias de *Cryphonectria parasitica* Murrill (Barr.) também foi alterado positivamente com a adição no meio de cultura dos solutos NaCl, KCl e mistura dos sais NaCl, KCl e Na_2SO_4 (5:3:2) em potenciais osmóticos semelhantes. Os autores atribuíram este efeito pode ser atribuído a adição de uma fonte de carbono no meio de cultura, o que favoreceu o desenvolvimento do patógeno (GAO & SHAIN, 1995).

ASSIS et al. (2001), utilizando meio BDA com diferentes fontes de carbono (glucose, maltose e amido), conseqüentemente alterando o potencial hídrico do meio de cultura, fizeram uma caracterização fisiológica de isolados de *Colletotrichum gloesporioides* (Penz.) Sacc., analisando o crescimento micelial e esporulação do fungo. O meio de cultura adicionado com amido obteve o maior crescimento micelial para a maioria dos isolados estudados. Em estudos realizados por CARVALHO (2001) verificou-se que em BDA adicionado de PEG (Polietilenoglicol) 6000, a medida que a quantidade de soluto aumentava no meio de cultura, o diâmetro das colônias de *Colletotrichum lindemuthianum* tinha seu crescimento micelial reduzido). Por outro lado, com adição de manitol em BDA o fungo teve seu crescimento favorecido até o nível de - 0,61MPa. MACHADO et al (2004) usando manitol como restritor hídrico verificaram que o crescimento micelial de *Botriodiplodia theobromae* Pat. e *Colletotrichum gossypii* (Costa) em meio BDA, não foi prejudicado pelos potenciais

¹ Eng^a Agr^a. Mestranda, bolsista CAPES, Programa de Pós-graduação em Fitossanidade. Departamento de Fitossanidade, FAEM/UFPEL. Campus Universitário s/nº Caixa Postal 354 CEP 96.010-900 Pelotas – RS. E-mail maris_rey@yahoo.com.br (Autor para Correspondência)

² Biólogo. Mestrando, bolsista CAPES, Programa de Pós-graduação em Fitossanidade. Departamento de Fitossanidade, FAEM/UFPEL. Campus Universitário s/nº Caixa Postal 354 CEP 96.010-900 Pelotas – RS.

³ Acadêmico do curso de Agronomia da UFPEL. Estagiário do Lab. Patologia de sementes.

⁴ Eng^a Agr^a, Ph. D., Professor Titular do Departamento de Fitossanidade, FAEM/UFPEL Campus Universitário s/nº Caixa Postal 354 CEP 96.010-900 Pelotas – RS

(Recebido para publicação em 16/11/2004, Aprovado em 15/07/2005)

hídricos - 0,4; - 0,6; - 0,8 e 1,0 MPa, e o crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* Schelecht e *C. gossypii* tiveram seu crescimento estimulado nos menores potenciais. MACHADO et al. (2001), também verificaram que o crescimento radial dos fungos *Fusarium moniliforme* (J. Sheld), *Cephalosporium acremonium* (Auct) e *Diplodia maydis* (Nisikado Y Miyake) Shoem. usando potenciais hídricos na faixa de -0,6 a 1,2 MPa, não foi alterado negativamente pelo manitol, exceto nos potenciais 1,0 e 1,2 MPa.

O trabalho objetivou avaliar a influência da restrição hídrica no crescimento micelial das raças 31 (kappa), 1673 e 2047 do fungo *C. lindemuthianum* (Sacc. Briosi) Cavara, agente causal da antracnose, doença de grande importância da cultura do feijoeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório de Patologia de sementes da Universidade Federal de Pelotas-Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel - Departamento de Fitossanidade.

Foram usadas as culturas das raças de *C. lindemuthianum*, identificadas pelo sistema binário proposto por HABGOOD (1970) e pelas plantas diferenciadoras propostas pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (Tabela 1).

A multiplicação do inóculo foi feita por repicagem de fragmentos de micélio que se encontravam em tubos de ensaio contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar) para placas de Petri de plástico com 9cm de diâmetro, contendo meio Mathur, constituído por peptona (2,0 gl⁻¹), dextrose (2,8 gl⁻¹), MgSO₄ (1,73 gl⁻¹), KH₂PO₄ (2,72 gl⁻¹) e ágar (20 gl⁻¹). Para os tratamentos com restrição foram usados os potenciais hídricos de - 0,6; - 0,8 e 1,0 MPa, com adição dos solutos, sacarose e NaCl. Logo após, discos de meio de cultura de aproximadamente 1,0 cm contendo o patógeno foram

dispostos no centro da placa de petri. Para o cálculo das concentrações foi usado o "Software SPMM". Os tratamentos e as testemunhas (Mathur sem restritor) foram acondicionados em câmara de incubação sob temperatura de 21° + ou - 2° com fotoperíodo de 12 horas. Os restritores foram adicionados junto ao meio de cultura antes da esterilização em autoclave.

O experimento foi constituído de 21 tratamentos com quatro repetições, utilizou-se as três raças e os dois solutos osmóticos nos três potenciais hídricos e uma testemunha contendo somente o meio Mathur sem adição de solutos. Para estudo dos resultados foi realizado teste de médias.

A avaliação do crescimento das colônias iniciou no quarto dia de crescimento, sendo realizadas as medições a cada 72 horas, num total de seis avaliações. O diâmetro das colônias foi medido utilizando-se uma régua comum transparente. Os resultados foram descritos conforme a avaliação em 312 horas, que demonstra o crescimento total das raças.

Os dados foram submetidos à análise estatística e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Duncan, analisado pelo programa PLOTIT.

O índice de crescimento micelial foi verificado a partir da fórmula proposta por OLIVEIRA (1991):

$$ICM = \frac{C_1 + C_2 + \dots + C_n}{N_1 + N_2 + \dots + N_n}$$

onde: ICM= crescimento micelial; C₁, C₂, .C_n = crescimento das colônias na primeira, segunda e última avaliação; N₁, N₂ e N_n número de dias.

Tabela 1 – Reação da série diferenciadora para as raças de *Colletotrichum lindemuthianum*. Pelotas – RS, 2004.

Série Diferenciadora	Patótipo		
	2047	31	1673
Michelite	S	S	S
Michigan Dark Red Kidney	S	S	R
Perry Marrow	S	S	R
Cornell 49-242	S	S	S
Widusa	S	S	R
Kaboon	S	R	R
México 222	S	R	R
PI 209262	S	R	S
TO	S	R	R
TU	S	R	S
AB 136	S	R	S
G 23333	R	R	R

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento das colônias de *C. lindemuthianum* se mostrou diferenciado com adição de solutos no meio de cultura, tanto em relação ao soluto como ao nível de restrição

utilizado. As três raças tiveram seu crescimento micelial diferenciado comparando-se com a testemunha. Conforme a figura 1, comparando-se as avaliações finais a raça 31 não obteve crescimento maior que a testemunha nos dois solutos e nos três potenciais utilizados, sendo que não ocorre

diferença estatística entre os tratamentos N -0,6 e S -0,6 e também N -1,0 e S -1,0, observando-se a avaliação em 312 horas, onde o patótipo demonstrou todo o seu desenvolvimento. A raça mostrou menor desenvolvimento, nos potenciais mais negativos, evidenciando que a adição de solutos no meio de cultura não favorece seu desenvolvimento. Este fato concorda com resultados mostrados por MACHADO et al. (2001) em relação ao crescimento *C. acremonium*, que mostrou crescimento reduzido quando chegou aos potenciais osmóticos de -1,0 e -1,2 MPa. Também pode ser comparado

com os resultados de um estudo feito com *Geotrichum candidum* Link., onde foi verificado um pronunciado decréscimo no diâmetro de colônias com 48 horas de idade, entre os potenciais de -15 a -2,5 MPa, no entanto foi observado um aumento no crescimento sob potenciais de -0,5 a -1,0MPa, com diferenças mínimas de entre os osmorreguladores KCl, PEG 400, e manitol (BAUDOIN & DAVIS, 1987). Evidenciando que algumas associações de solutos com potenciais hídricos altos podem alterar negativamente o crescimento da colônia de alguns fungos.

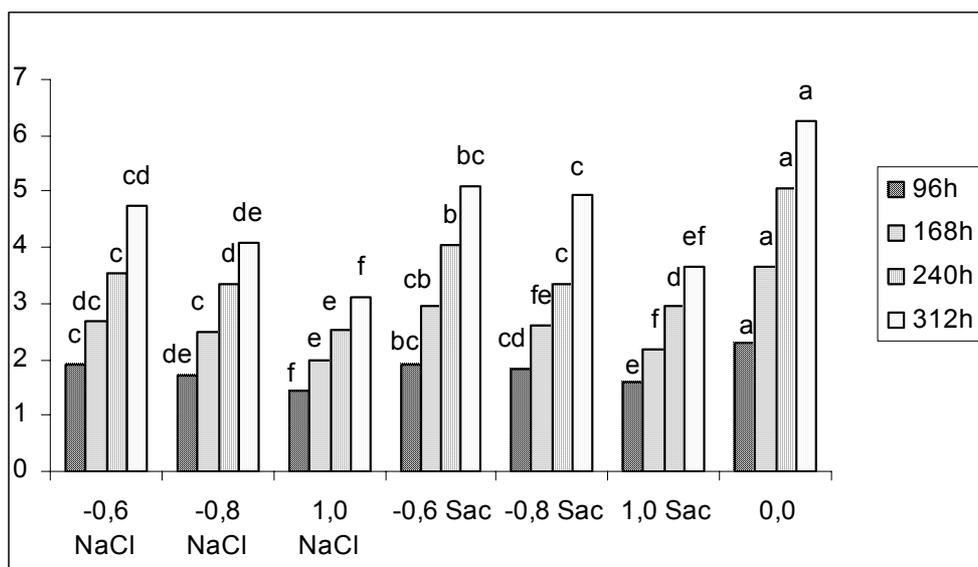


Figura 1 – Crescimento micelial da raça 31 (kappa) de *Colletotrichum lindemuthianum* as 96, 168, 240 e 312 horas de crescimento, sob influência de restrição hídrica no meio Mathur. Pelotas, 2005 (médias seguidas pelas mesmas letras em uma mesma avaliação não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan a 5% de significância).

O patótipo 1673, este de alta virulência, mostrou comportamento positivo com relação à adição de solutos no meio de cultura, pois seu crescimento se diferenciou da testemunha em todos os potenciais com os dois solutos utilizados, porém não houve diferença estatística entre a maioria dos tratamentos, havendo diferença apenas dos tratamentos em relação à testemunha, porém atingindo seu pico máximo de crescimento nos potenciais -0,6 e -0,8 MPa quando utilizado sacarose, tendendo ao declínio na faixa de restrição de -1,0 MPa (figura 2). Este resultado traça um paralelo com aqueles realizados por CARVALHO et al. (2001) que observaram que colônias de *C. lindemuthianum* apresentam um maior diâmetro médio em BDA modificado osmoticamente com manitol, superior a testemunha, até o nível de restrição de -0,6MPa, tendendo ao declínio em potenciais hídricos mais negativos até a restrição de 1,0 MPa. Na raça 2047, o crescimento radial das colônias mostrou-se positivo com relação ao tratamento sem restrição (figura 3). O patótipo obteve crescimento ótimo quando utilizado o menor potencial osmótico, tanto com a adição de sacarose como de NaCl. A raça que atingiu o maior ICM (Índice de Crescimento Micelial) foi 2047 utilizando um potencial de -0,6MPa, tanto com NaCl como sacarose.

Verifica-se que as raças 1673 e 2047 se desenvolveram

de maneira superior à raça 31, tanto usando NaCl como sacarose no meio de cultura. Para este comportamento diferenciado sugere-se a hipótese de raças de *C. lindemuthianum* com alta virulência apresentam maior facilidade de absorção sob restrição hídrica, podendo assim favorecer seu crescimento vegetativo no interior dos tecidos do hospedeiro. Nestas raças, a sacarose mostrou-se de grande utilidade para o aumento do crescimento das colônias de *C. lindemuthianum*, quando comparados com a testemunha. O aumento do crescimento radial do patógeno, pode ser atribuído à adição da fonte de carbono (GAO & SHAIN, 1995), facilmente metabolizado por *C. lindemuthianum*.

Os ajustes osmóticos de -0,6 e -0,8 MPa também proporcionaram uma ótima absorção do açúcar pelo fungo, conseqüentemente, fácil absorção de energia e também um melhor ajuste osmótico da célula fúngica propiciado pela absorção dos solutos, permitindo maior turgor para extensão celular (COUTINHO et al., 2001). O uso de sacarose para restringir a quantidade de água do meio de cultura também proporcionou o aumento no diâmetro de colônia de *Ascochyta paspali* (MORLEY et al., 1993), *Alternaria alternata* e *Botrytis cinerea* (ALAM et al., 1996), concordando com os resultados deste trabalho.

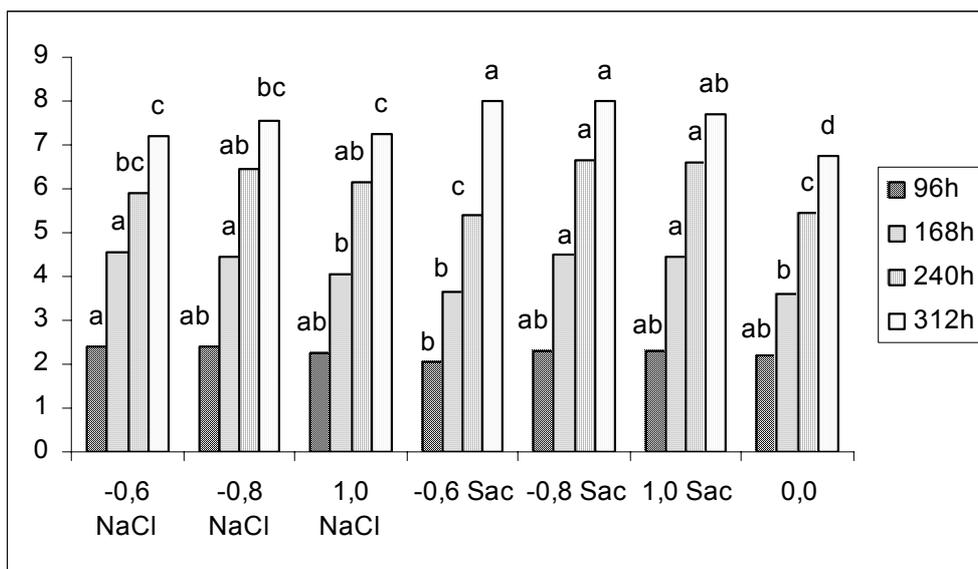


Figura 2 – Crescimento micelial da raça 1673 de *Colletotrichum lindemuthianum* avaliado às 96, 168, 240 e 312 horas de crescimento, sob influência de restrição hídrica no meio Mathur. Pelotas, 2005 (médias seguidas pelas mesmas letras em uma mesma avaliação não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan a 5% de significância).

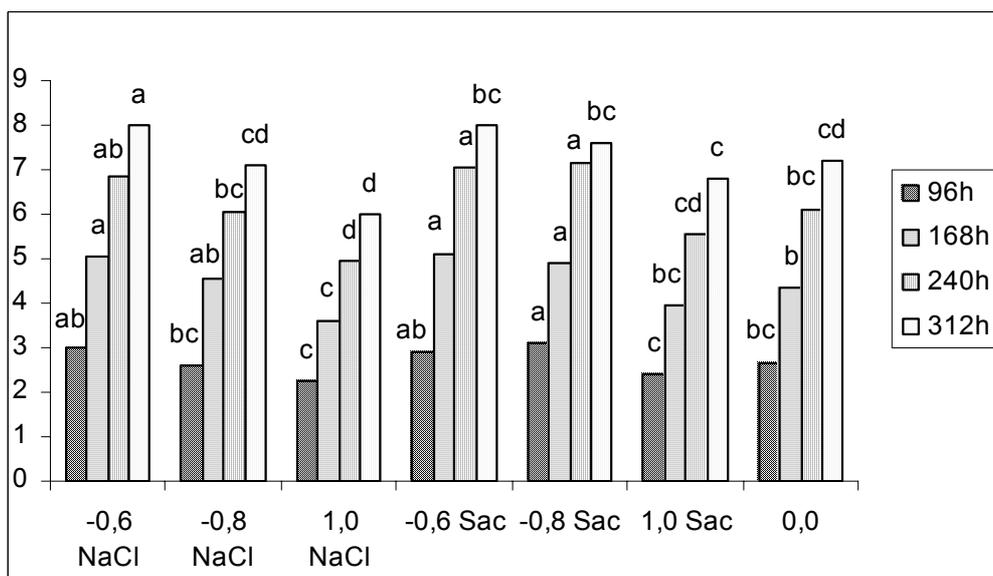


Figura 3 – Crescimento micelial da raça 1673 de *Colletotrichum lindemuthianum* avaliado às 96, 168, 240 e 312 horas de crescimento, sob influência de restrição hídrica no meio Mathur. Pelotas, 2005 (médias seguidas pelas mesmas letras em uma mesma avaliação não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan a 5% de significância).

Os resultados mostram que as raças, com exceção do patótipo 31 evidenciaram a sacarose como de grande utilidade para o aumento ou aceleração do crescimento das colônias de *C. lindemuthianum*, quando comparados com a testemunha. O uso de sacarose para restringir a quantidade de água do meio de cultura também proporcionou o aumento no diâmetro de colônia de *Criphonectria parasitica* quando comparado com os

solutos NaCl, KCl, CaCl₂ e NaSO₂ (COUTINHO et al., 2001).

Os resultados indicam que a restrição hídrica pode ser utilizada para impedir a germinação de sementes em testes de sanidade para detecção de *C. lindemuthianum* ao nível de -0,6 a -0,8MPa sem afetar o desenvolvimento do patógeno. Com relação à raça kappa, mais estudos devem ser

conduzidos para que se possa melhor detalhado o comportamento negativo desta raça com relação à restrição hídrica.

CONCLUSÃO

Existe variabilidade entre raças de *Colletotrichum lindemuthianum*, quanto ao crescimento micelial em diferentes níveis de restrição hídrica.

ABSTRACT

The water restriction bases on modifying the osmotic potential of culture media or substratum using osmotic solutes. It is a technique that has been tested as method for avoiding the germination of seeds in health tests without affecting the detection of pathogenic fungi. The objective of this work was to evaluate the micelial growth of the races, 31(kappa), 1673 and 2047 of Colletotrichum lindemuthianum, causal agent of Anthracnose, disease that causes great damages in the bean crop. In the Mathur culture medium, the solutes used to modify the water potential were sucrose and NaCl, in the osmotic potentials - 0.6, - 0.8 MPa and 1.0 MPa. The amount of solute used to reach the levels of water restriction was calculated by the "software SPMM - Solute potential and molar-molar-g water conversion." The fungi was removed and put for incubation under temperature of 22° C, and 12 hour photoperiod. The results showed that happened a variation in the behavior of the races of C. lindemuthianum regarding the osmotic potencies and to the used solutes. The race 31 grew negatively with the use of the osmotic restriction, tends reduced growth in all the potentials regarding checks. The race 1673, the radial growth was maximum in the potentials - 0.6 and - 0.8 MPa using sucrose as restrictor, differentiating positively of the check. The race 2047 obtained maximum growth in the potential - 0.6 so as well with NaCl as sucrose.

Key words: water restriction, osmotic potential, races.

REFERÊNCIAS

- ALAM, S.; JOICE, D.; WEARING, A. Effects of equilibrium relative humidity on in vitro growth of *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, East Melbourne, v. 36, n. 3, p. 383-388, 1996.
- ASSIS, T. C.; MENEZES, M.; ANDRADE, D. E. et al.. Estudo comparativo de isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* a respeito do efeito da nutrição do hidrato de carbono no crescimento, esporulação e na patogenicidade em três variedades de morango. **Summa Phytopatologica, São Paulo**, v.27, n.2, p. 202-212, 2002.
- BAUDOIN, A.B.A.M.; DAVIS, L.L. Effect of osmotic and matric potential growth of *Geotrichum candidum*. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 8, n.3, p. 323-328, 1987.
- CARVALHO, J. C. B. de. **Uso de restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1999. 98 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- CARVALHO, J. C. B.; MACHADO, J. C. ; VIEIRA, G. M. Crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum* em relação à restrição hídrica do substrato agarizado. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 25, n. 4, p. 999-1005, 2001.
- COOK, J. R.; PAPENDICH, R. I. Role of water potential in microbial growth and development of plant disease, with special reference to postharvest pathology. **Hort Science**, Alexandria, v. 13, n. 5, p. 559-564, 1978.
- COUTINHO, W. M. **Uso de restrição hídrica no controle da germinação de sementes de arroz (*Oriza sativa* L.) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em testes de sanidade**. 2000. 78p. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- COUTINHO, W. M. MACHADO, J.C.; VIEIRA, M.G.G.C. et al. Uso da restrição hídrica na inibição ou retardamento da germinação de sementes de arroz e feijão submetidas ao teste de sanidade em meio ágar-água. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, V. 23, n. 2, p. 127-135, 2001.
- DUNIWAY, J. M. Water relations of water molds. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 17, n. 1, p. 431-467, 1979.
- FARIAS, C. R. J.; DELPONTE, E. M.; DAL MAGRO, T. Inibição da germinação de sementes de trigo e milho em testes de sanidade em substrato papel. **Revista Brasileira de Agrociência**, Londrina v. 9, n. 2, p. 141-144. 2003.
- GAO, S.; SHAIN, L. Effects of osmotic potential on virulent and hypovirulent strains of the Chestnut blight fungus. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 25, n. 6, p. 1024-1029, 1995.
- MACHADO, J. C.; Oliveira, J.A.; Vieira, M.G.G.C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina v. 23, n. 2, p. 88-94, 2001.
- MACHADO, J. C.; Oliveira, J.A.; Vieira M.G.G.C. et al. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos, utilizando manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 95-101, 2001.
- MACHADO, J.C.; Oliveira, J.A. de, Vieira, M. das G.G.C. et al. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodão. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 62-67, 2004.
- MORLEY, T. B.; WILLIAMS, B. L.; PRICE, T. V. The effects of water stress on the incidence and severity of paspalum leaf blight and on *Ascochyta paspali*. **Australian Plant Pathology**, Sidney, v. 22, n. 3, p. 105-110, 1993.
- OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.)**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, (Dissertação de mestrado). 111p. 1991
- SOMMERS, E.; HARRIS, R. F.; DALTON, F. N. et al. Water potential relation of three root-infecting *Phytophthora* species. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, n. 6, p. 932-934, 1970.
- SUBBARAO, K.V.; MICHAILIDES, T. J.; MORGAN, D. P. Effects of osmotic potential and temperature on growth of pathogens of figs and a control a biocontrol agent. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 12, p. 1454-1459, 1993.
- WEARING, A. H.; BURGESS, L. W. Water potential and the saprophytic growth of *Fusarium roseum* "graminearum". **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 11, n. 6, p. 661-667, 1979.