

AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE ESPOROS DO FUNGO *Pyrenophora teres*

Yasmin Carolina Rigoldi(PIBIC/CNPq/FA/UEM), Priscila Angelotti-Zampar (Co-orientadora), Celso Martins França (PIC/UEM), Gabriela Pereira de Paula (PIC/UEM), Lucas Pereira da Silva (Mestrando/PGA/UEM), Giovanna Seron, Dauri José Tessmann(Orientador), e-mail: yasminpic@hotmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Agrárias, PR.

50000004 – Ciências Agrárias/ 50100009 – Agronomia/ 50102010 Fitopatologia.

Palavras-chave: *Pyrenophora teres*, mancha-em-rede, *Hordeum vulgare*

Resumo:

O cultivo da cevada (*Hordeum vulgare*) vem se destacando no Brasil, no entanto, dentre os fatores limitantes para a sua produção encontra-se as doenças fúngicas. Sendo que, a mancha-em-rede causada por *Pyrenophora teres* compreende a principal mancha foliar que acomete a cultura, que além de reduzir expressivamente o rendimento e qualidade dos grãos ainda é a demanda grande investimento para seu controle. Diante disso, estudos de patogenicidade e controle são necessários, visto que poucos trabalhos são encontrados na literatura. No entanto, tais estudos requerem a produção massal, *in vitro*, de esporos do patógeno. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de esporos de *Pyrenophora teres* em diferentes meios de cultura. Dessa forma, isolados do fungo foram avaliados em cinco meios de cultura diferentes (BDA10%, BDA25%, BDA+V8, V8+3g de CaCO₃ e V8+6g de CaCO₃) em dois momentos de avaliação (7 e 14 dias). Para tal, discos de micélio do patógeno foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo os meios de cultura estéreis e, em seguida incubados em câmara de crescimento. Após sete dias realizou-se fermentos nas hifas, para estimular a esporulação. As avaliações de esporulação foram realizadas com hemocitômetro aos 7 e 14 dias após o fermento. O fungo apresentou esporos em todos os meios de cultura testados, sendo assim os mesmos se mostraram eficientes na produção de esporo nos dois períodos de armazenamento. De tal forma que, todos podem ser utilizados para a produção massal de esporos.

Introdução

A cultura da cevada (*Hordeum vulgare*) vem destacando-se como um importante cereal de inverno no Brasil, sua produção destina-

se principalmente para a indústria cervejeira. Assim como ocorre em todos os cultivos agrícolas, vários fatores podem ser limitantes para a sua produção. Dentre eles estão às doenças causadas por patógenos fúngicos. A mancha-em-rede causada por *Pyrenophora teres* encontra-se como uma das doenças mais importantes que acometem a cultura no país. Essa mancha foliar é capaz de reduzir potencialmente o rendimento da cultura além de afetar a qualidade dos grãos o que pode interferir no seu aproveitamento industrial (FORCELINI & REIS, 2005).

Na sua fase sexuada o fungo produz estruturas reprodutivas chamadas pseudotécios, que liberam ascósporos, esses por sua vez são responsáveis pela infecção. Enquanto na sua fase assexuada os esporos infectivos são os conídios, sendo esses produzidos em maior quantidade nas lavouras de cevada. Tratar-se de um fungo necrotrófico, ou seja, possui a capacidade de sobreviver em restos culturais de cevada em uma fase saprofítica, característica essa que possibilita seu cultivo *in vitro* em meio de cultura (FORCELINI & REIS, 2005).

Considerando a importância da mancha-em-rede para a cevada e a necessidade de estudos com a finalidade de reduzir seu impacto sobre a cultura. Porém, para a realização de ensaios de controle e patogenicidade faz-se necessária à produção massal *in vitro* de esporos assexuados. Desse modo, encontrar meios de cultura que induzem a produção *in vitro* de esporos em maior quantidade em menor tempo é de suma importância. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a produção de esporos *in vitro* de *Pyrenophora teres*, agente causal da mancha-em-rede da cevada, em cinco diferentes meios de cultura e dois períodos de armazenamento 7 e 14 dias.

Materiais e métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitossanidade da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os isolados (111,179,1321) de *Pyrenophora teres* utilizados foram obtidos da micoteca do laboratório e o delineamento experimental adotado inteiramente casualizado com quatro repetições e dois períodos de incubação. Cada repetição foi representada por uma placa de Petri contendo meio de cultura.

Cinco meios de cultura foram testados com a finalidade de avaliar a produção de esporos, sendo eles: V8 + 3g de CaCO₃, V8 + 6g de CaCO₃, V8 + BDA (batata-dextrose-ágar), e BDA nas concentrações 10% e 25%. Para o preparo dos meios contendo BDA, utilizou-se o produto comercial, BDA (Himedia). As quantidades utilizadas foram calculadas de acordo com as orientações do fabricante, sendo este suplementado com ágar para promover a solidificação. Já para o preparo dos meios contendo suco V8, 200 ml de suco V8 foi adicionado em 800 ml de água, e adicionado de 20g de ágar, para solidificação e em seguida adicionou-se o CaCO₃ (3 e 6 gramas). O meio de cultura V8 + BDA, foi composto de 50% do meio V8 com 3g de CaCO₃ e 50% do produto comercial. Os meios de cultura foram

aconicionados em Erlenmeyer e esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos.

Após a esterilização, 15 ml dos meios foram depositadas em placas de Petri de 90 mm de diâmetro. Posteriormente, transferiu-se um disco de micélio de 4 mm de diâmetro contendo o fungo *P. teres* para o centro de cada placa. As placas foram vedadas com plástico filme e acondicionadas em câmara BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) durante oito dias (período necessário para que a colônia ocupe toda superfície da placa), a $\pm 23^\circ\text{C}$ dia e $\pm 17^\circ\text{C}$ noite, em regime de 12 horas de luz negra. Após esse período as colônias foram retiradas da incubadora, levadas para a câmara de fluxo laminar e submetida a estresse, por meio da realização de fermentos nas hifas com o auxílio de uma lâmina de vidro estéril (STOLTE, 2006; CAMPBELL et al. 2003). Em seguida as placas sem vedação foram devolvidas para a câmara de crescimento, e quantificação de conídios realizada aos 7 e 14 dias utilizando o hemacitômetro (ZAUZA et al. (2007). Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância, em seguida comparados pelo teste de comparações múltiplas Tukey, a 5% de significância.

Resultados e Discussão

Os dados foram transformados $(X+1)^{0,5}$ e atendidas as pressuposições básicas para a análise de variância (erros com distribuição normal; erros homocedásticos), os dados foram submetidos à ANOVA. Verificado a significância procedeu-se com o teste Tukey ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas através do software SISVAR 5.6.

Tabela1: Quantidade de esporos (conídios/ml) produzidos em diferentes meios de cultura em sete dias após estresse.

Meios de cultura	Isolado 111	Isolado 179	Isolado 1321	Média
BDA 10%	$3,8 \cdot 10^4$ ab	$1,6 \cdot 10^5$ a	0 d	$6,6 \cdot 10^4$ b
BDA 25%	$7,5 \cdot 10^3$ b	$9,0 \cdot 10^4$ b	$4,0 \cdot 10^4$ bc	$2,0 \cdot 10^4$ b
V8 - BDA	$2,5 \cdot 10^3$ b	$6,3 \cdot 10^4$ bc	$9,3 \cdot 10^4$ ab	$5,3 \cdot 10^4$ b
V8 – 3g CaCO ₃	$5,0 \cdot 10^4$ a	$7,0 \cdot 10^4$ bc	$1,8 \cdot 10^5$ a	$1,0 \cdot 10^5$ a
V8 – 6g CaCO ₃	$8,3 \cdot 10^4$ a	$5,0 \cdot 10^4$ c	$2,3 \cdot 10^4$ cd	$5,2 \cdot 10^4$ b

Média seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.

Tabela 2: Quantidade de esporos (conídios/ml) produzidos em diferentes meios de cultura 14 dias após estresse.

Meios de cultura	Isolado 111	Isolado 179	Isolado 1321	Média
BDA 10%	$2,5 \cdot 10^4$ b	$8,0 \cdot 10^4$ a	$2,5 \cdot 10^3$ c	$3,6 \cdot 10^4$ ab
BDA 25%	$1,0 \cdot 10^4$ b	$6,8 \cdot 10^4$ ab	$3,8 \cdot 10^4$ b	$3,9 \cdot 10^4$ ab
V8 - BDA	$1,0 \cdot 10^4$ b	$3,0 \cdot 10^4$ c	$5,0 \cdot 10^4$ ab	$3,0 \cdot 10^4$ b
V8 – 3g CaCO ₃	$7,0 \cdot 10^4$ a	$5,0 \cdot 10^4$ bc	$8,0 \cdot 10^4$ a	$6,7 \cdot 10^4$ a
V8 – 6g CaCO ₃	$7,0 \cdot 10^4$ a	$5,0 \cdot 10^4$ bc	$3,5 \cdot 10^4$ b	$5,2 \cdot 10^4$ a

Média seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.

O número de esporos obtidos variaram entre os diferentes meios de cultura utilizados. O meio de cultura V8 – 3g e 6g de CaCO_3 apresentou-se superior ao meio V8+BDA e BDA 25% nos dois períodos de armazenamento, sendo que para período mais longo de armazenamento ele superou todos os meios contendo BDA, para os isolados 111 (Tabela 1 e 2). Enquanto para o isolado 179 apresentou o maior número de esporos no meio BDA 10% e o menor em V8 com 6g de CaCO_3 . Em contra partida, o isolado 1321 apresentou os piores resultados para o meio BDA 10% (Tabela 1). Aos 7 dias de armazenamento as melhores médias foram apresentadas pelo meio V8 com adição de 3g de CaCO_3 , e os demais meios não se diferiram significativamente entre si. Aos 14 dias, as medias apresentadas pelos meios V8 com 3 e 6g de CaCO_3 superaram o meio V8+BDA. Nos isolados 111 e 1321 o meio V8 com 3 g CaCO_3 superou os meios BDA 10 e 25%.

Conclusões

Todos os meios de cultura testados promoveram a produção de esporos do fungo *P. teresaos* 7 e 14 dias. Ou seja, todos os meios utilizados mostraram-se positivos para induzir a produção de esporos do fungo *P. teres*.

Agradecimentos

A Universidade Estadual de Maringá e ao CNPq.

Referências

CAMPBELL, M. A.; MEDD, R. W.; BROWN, J. B. Optimizing conditions for growth and sporulation of *Pyrenophora semeniperda*. **Plant Pathology**, v. 52, n. 4, p. 448-454, 2003.

FORCELINI, C.A, REIS, E.M. Doenças da cevada. In. KIMATI, H., AMORIM, L., REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia. Doenças das Plantas Cultivadas** .vol. 2. Piracicaba: Editora Ceres. 2005. p. 231-232.

STOLTER, E. **Sensibilidade de *Bipolaris sorokiniana* e de *Drechslera tritici-repentis* a Fungicida 'in vitro'**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo, 2006.

ZAUZA, E. A. V., ALFENAS, A. C., MAFIA, R. G. Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: ALFENAS, A.C., MAFIA, R.G. (eds.). **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: Editora UFV. 2007. P.23-51.