

INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA E DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO MICELIAL E ESPORULAÇÃO DO FUNGO *Colletotrichum gloeosporioides*, CAUSADOR DA PODRIDÃO DA UVA MADURA

Giovanna Vitoria Bueno (PIBIC/CNPq), Paula Cristina dos Santos Rodrigues (Co-orientadora), Giovanna Seron (Co-orientadora), Dauri José Tessmann (Orientador).
E-mail: djtessmann@uem.br

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

Ciências Agrárias / Agronomia / Fitossanidade / Fitopatologia

Palavras-chave: Inóculo de fungo; Podridão madura; *Vitis spp.*

RESUMO

A podridão da uva madura, conhecida como podridão de glomerela, é causada pelo complexo fúngico *Colletotrichum gloeosporioides*. Este estudo teve como objetivo isolar *C. gloeosporioides* de cachos de uva com sintoma de podridão e avaliar a influência do meio de cultivo e da temperatura no crescimento e na produção de esporos. Quatro isolados foram cultivados nos meios aveia, batata-dextrose-água (BDA), milho e V8. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x5, com cinco repetições por tratamento. O meio de aveia, que apresentou melhor desempenho na esporulação, foi utilizado no ensaio de temperaturas, conduzido a 15, 20, 25 e 30 °C, sob fotoperíodo de 12 horas. Os dados do ensaio foram analisados por regressão quadrática. O isolado 1 teve maior esporulação a 30 °C, enquanto o isolado 2 também atingiu seu pico nessa temperatura, porém com baixa taxa. O isolado 3 não esporulou em nenhuma condição, e o isolado 4 apresentou maior esporulação a 25 °C.

INTRODUÇÃO

Colletotrichum gloeosporioides (Penz) Penz & Sacc. é um fungo classificado como parasita não obrigatório, capaz de sobreviver fora do hospedeiro, o que possibilita seu cultivo em meio de cultura (MENEZES & HANLIN, 1996a). A obtenção de isolados puros é essencial para estudos relacionados à patogenicidade, resistência genética de plantas e sensibilidade a fungicidas (RÊGO et al., 2014). Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo obter isolados de *C. gloeosporioides* e avaliar fatores culturais e ambientais que influenciam a produção de inóculo, testando os meios de cultura aveia, batata-dextrose-água (BDA), milho e V8 quanto ao crescimento micelial e à esporulação, além de determinar a temperatura mais adequada para esses processos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os testes foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Maringá. No estudo utilizaram-se quatro isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos a partir de bagas de uva sintomáticas coletadas em Marialva-PR. Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e mantidas por sete dias na incubadora *Biochemical Oxygen Demand* (BOD), com temperatura e controlada nas condições de 25 ± 2 °C.

Para o ensaio da influência do meio de cultura no crescimento micelial e esporulação, foram preparados os quatro meios de cultura, sendo eles: milho, aveia, BDA e V8. Para a preparação do meio BDA, foi utilizado 250 g batata, 20 g ágar, 20 g dextrose e 1000 mL água. Para o preparo do meio de milho, foi utilizado 500g de farinha de milho, 10g de dextrose, 15g de ágar e 1 litro de água. Para o meio de aveia, foi utilizado 30g de aveia, 15g de ágar e 1 litro de água. Já para o V8, foi utilizado 200ml de suco V8, 17g de ágar, 6g de carbonato diluído em 200ml de água e completou-se com 800ml de água.

Cada meio de cultura foi autoclavado a 121 °C por 20 minutos e, em seguida, vertido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, adicionando-se 20 mL por placa. Discos de micélio de 5 mm, obtidos dos isolados de *C. gloeosporioides*, foram transferidos para o centro das placas, que posteriormente foram incubadas em BOD. Cada tratamento foi constituído por cinco repetições, sendo considerada uma repetição uma placa de Petri.

A avaliação do crescimento micelial foi realizada no 7º dia de incubação, utilizando-se um paquímetro para medir o diâmetro das colônias em centímetros. A esporulação foi avaliada no 14º dia de incubação. Adicionaram-se 20 mL de água destilada estéril em cada placa, seguido da raspagem das estruturas fúngicas. A suspensão obtida foi filtrada em gaze para reter as hifas, originando uma suspensão de esporos, posteriormente quantificada com auxílio de um hemocitômetro.

O ensaio para avaliar a influência da temperatura na esporulação foi realizado com base nos resultados obtidos previamente no teste de influência dos meios de cultura, sendo selecionado o meio de aveia. Em cada placa foi inoculado um disco de micélio dos isolados, cada tratamento foi constituído por cinco repetições. As placas foram distribuídas inteiramente ao acaso e mantidas em BOD, ajustadas para as temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C. A avaliação da esporulação foi realizada 14 dias após a inoculação, seguindo a mesma metodologia adotada no ensaio anterior.

Para a análise estatística dos dados, utilizou-se o teste de LSD (Least Significant Difference) na comparação do crescimento micelial entre os diferentes meios de cultura. A esporulação foi analisada por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, em função da heterogeneidade dos dados. Já para avaliar a resposta da temperatura sobre o desenvolvimento do fungo, foi aplicada a análise de regressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise do teste de influência dos meios de cultura sobre o crescimento micelial de isolados de *C. gloeosporioides*, a análise de variância indicou diferença estatística significativa tanto entre os isolados quanto entre os meios de cultura ($p < 0,01$). A diferença encontrada pelo teste LSD destaca que os meios BDA e V8 foram

mais favoráveis ao desenvolvimento do crescimento micelial (Tabela 1), o que pode estar relacionado à disponibilidade de nutrientes nesses meios.

Tabela 1 – Teste de média do crescimento micelial (cm) de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Meio de cultura	Isolado 1	Isolado 2	Isolado 3	Isolado 4	Média
BDA	5,64	6,58	7,02	6,66	6.47a
V8	5,8	6,14	6,58	6,24	6.19a
Milho	5,4	6,46	6,56	5,78	6.05ab
Aveia	3,98	6,3	6,36	5,74	5.59b
Média	5.205c	6.37ab	6.63a	6.105b	

Médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de diferença mínima significativa - LSD ($p < 0,001$).

A avaliação da esporulação dos isolados avaliada com teste estatístico não paramétrico revelou diferença estatística significativa ($p = 0,1$), sendo que os meios de aveia e de milho proporcionaram as maiores taxas de esporulação (Tabela 2) reforçando a importância da escolha do meio de cultura, já que determinados meios podem estimular preferencialmente o crescimento vegetativo, enquanto outros induzem a esporulação.

Tabela 2 – Média de esporos $\times 10^4$ por ml da suspensão de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Meio de cultura	Isolado 1	Isolado 2	Isolado 3	Isolado 4	Rank ¹
BDA	18,25	3,75	7	109,75	23,21b
V8	8,5	37,25	13	88,5	31,56ab
Milho	561,25	107	1,25	225,25	37,91a
Aveia	4808,25	13	2	256,5	37,31a
Rank	37,22b	29,12b	15,03c	48,62a	

¹ Valores de médias seguidos pelo resultado do teste de Kruskal-Wallis ($\chi^2 = 6.44$; $p = 0,0918$).

A escolha do meio de aveia para a segunda etapa do projeto foi estratégica, uma vez que esse meio se destacou na indução de esporulação, fornecendo quantidade suficiente de estruturas reprodutivas para análises subsequentes. A utilização de modelos de regressão quadrática para descrever a relação entre esporulação e temperatura é adequada, já que o comportamento biológico de fungos em função de fatores ambientais geralmente apresenta respostas não lineares, com um ponto ótimo em determinada faixa de temperatura.

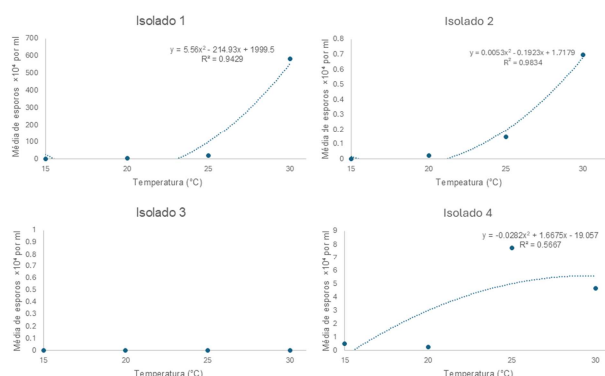


Figura 1 - Gráfico da média de esporos $\times 10^4$ por mL dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em resposta a diferentes temperaturas (°C).

A análise de regressão revelou que a temperatura de 30 °C favoreceu a maior esporulação do isolado 1. Embora o isolado 2 também tenha apresentado seu pico de esporulação nessa mesma temperatura, sua taxa foi considerada baixa. O isolado 3 não apresentou esporulação em nenhuma das condições testadas, enquanto o isolado 4 atingiu seu desempenho máximo a 25 °C.

CONCLUSÕES

Os meios de cultura influenciam significativamente o crescimento micelial e a esporulação de isolados de *C. gloeosporioides*. Os meios BDA e V8 favoreceram o crescimento micelial, enquanto os meios à base de aveia e milho promoveram maior esporulação. Em relação à temperatura, os isolados apresentaram variações nas taxas de esporulação, porém todos demonstraram baixa capacidade esporulatória em temperaturas inferiores a 25 °C.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa, e o Grupo de Estudos em Fitopatologia da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

REFERÊNCIAS

MENEZES, M. & HANLIN, R.T. Apressoria of Brazilian isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of anthracnoses diseases. **Revista de Microbiologia** 27:247–251. 1996a.

RÊGO, M. T. C.; ANGELOTTI, F.; BARROS, J. R. A.; SILVA, R. M. e; OLIVEIRA, N. P. dos S.; OLIVEIRA, F. O. E. C. de. Crescimento e esporulação de *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. cepae sob diferentes temperaturas. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 2, p. 96–104, 2014.