

Efeitos de meio de cultura, fontes de carbono e nitrogênio, pH e regime luminoso no crescimento de *Mycosphaerella musicola*^{1, 2}

Angélica Virgínia Valois Montarroyos^{3,5}, Rildo Sartori Barbosa Coelho⁴, Gabriela de Moraes Guerra Ferraz³, Rômulo dos Santos³, Venézio Felipe dos Santos³, Paulo Paes de Andrade⁵

¹Pesquisa financiada pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE, APQ – 0234-2.02/02.

²Este trabalho é parte da tese de doutorado da primeira autora pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

³Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Rua Manoel de Arruda Câmara, 120/603, Prado, CEP 50.720-140, Recife, PE, e-mail: angelica@terra.com.br; ⁴Departamento de Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52.171-900, Recife, PE, ⁵Universidade Federal de Pernambuco, CEP 50.670-901, Recife, PE.

Autora para correspondência: Angélica Virgínia Valois Montarroyos

Data de chegada: 27/07/2005. Aceito para publicação em: 02/02/2006.

1232

RESUMO

Montarroyos, A.V.V., Coelho, R.S.B., Ferraz, G. de M.G., Santos, R. Dos, Santos, V.F. dos, Andrade, P.P. de. Efeitos de meio de cultura, fontes de carbono e nitrogênio, pH e regime luminoso no crescimento de *Mycosphaerella musicola*. *Summa Phytopathologica*, v.33, n.1, p.86-89, 2007.

Este trabalho objetivou o estabelecimento de condições favoráveis ao crescimento micelial de *M. musicola in vitro*, pela avaliação em quatro experimentos, da influência de diferentes meios de cultura (BDA, BDA/IFB, V8, V8/IFB, V8/CaCO₃ e V8/CaCO₃/IFB); combinações de fontes de carbono (dextrose, maltose, sacarose e xilose) e nitrogênio (peptona, glicina, nitrato de potássio e de sódio); valores de pH (6,8; 6,4; 5,7 e 4,9) e regimes luminosos (escuro contínuo, alternância luminosa

e claro contínuo). Observou-se um maior crescimento de *M. musicola* quando cultivado nos meios de cultura BDA/IFB, V8/IFB e BDA. As fontes de carbono sacarose, maltose e dextrose quando combinadas com a peptona como fonte de nitrogênio, promoveram um maior crescimento micelial de *M. musicola*. O meio de cultura BDA/IFB, com o valor final de pH ajustado para 5,7, em regime de escuro contínuo, apresentou-se como o melhor para o crescimento de *M. musicola*.

Palavras-chave adicionais: *Pseudocercospora musae*, mal-de-sigatoka, sigatoka amarela, banana.

ABSTRACT

Montarroyos, A.V.V., Coelho, R.S.B., Ferraz, G. de M.G., Santos, R. Dos, Santos, V.F. dos, Andrade, P.P. de. Effects of medium, carbon and nitrogen source, pH and light on the growth of *Mycosphaerella musicola*. *Summa Phytopathologica*, v.33, n.1, p.86-89, 2007.

This work aimed the establishment of the best growth conditions of *M. musicola* mycelia *in vitro* through the analysis of the influence of different culture media (BDA, BDA/IFB, V8, V8/IFB, V8/CaCO₃ and V8/CaCO₃/IFB), combinations of carbon (dextrose, maltose, sucrose and xylose) and nitrogen (peptone, glycine, potassium nitrate and sodium nitrate) sources, medium pH values (6.8, 6.4, 5.7 and 4.9) and photoperiods (continuous darkness, alternating darkness/lightness and continuous lightness). At the end of the evaluation period, cultural

parameters and the dry weights of colonies were annotated. BDA/IFB, V8/IFB and BDA culture media promoted the best mycelial growth. The experiments also demonstrated that dextrose and sucrose when combined with peptose as a nitrogen source, are the best carbon sources as they promoted the most vigorous mycelial growth. The use of BDA/IFB culture medium, with its final pH adjusted to 5.7, and a photoperiod of continuous darkness was the best condition for the growth of *M. musicola*.

Additional keywords: *Pseudocercospora musae*, sigatoka disease, yellow sigatoka, banana.

O fungo fitopatogênico *Mycosphaerella musicola* Leach, forma teleomórfica de *Pseudocercospora musae* (Zimm.) Deighton (9), causador da doença sigatoka-amarela, constitui-se em um dos principais problemas da bananicultura no Brasil (3, 12, 15).

A obtenção de cultura pura de *M. musicola* é dificultada pelo seu

lento crescimento e baixa esporulação *in vitro* (14). A composição do meio de cultura, as fontes de carbono e nitrogênio, o pH do meio de cultura e os regimes de luminosidade são mencionados como os principais fatores para a obtenção de culturas *in vitro* de diversos fungos fitopatogênicos (2, 6, 13).

Este trabalho objetivou o estabelecimento de condições de cultivo que promovam um maior crescimento micelial de *M. musicola in vitro*. O trabalho conduzido constou de quatro experimentos nos quais foi utilizado um isolado de *M. musicola* obtido de folhas infectadas de bananeira "Pacovan", proveniente do município de Igarassu, PE.

Os meios de cultura utilizados nos experimentos foram autoclavados durante 15 minutos a 121°C, tendo os valores de pH sido aferidos posteriormente. A inoculação do isolado nos meios de cultura foi realizada por meio da transferência direta de esporodóquios do fungo, obtidos de fragmentos de tecido foliar infectado, mantidos em câmara úmida durante 24 horas. Foram efetuadas três inoculações por placa de Petri. Os experimentos foram conduzidos em condições de alternância luminosa (12 h claro/12 h escuro), a exceção do experimento de regimes luminosos, e temperatura de 28°C ± 2°C.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, tendo sido considerados seis tratamentos para o experimento de meios de cultura, quatro para o de valores de pH e três para o de regimes luminosos. O experimento sobre fontes de carbono e nitrogênio foi conduzido em arranjo fatorial 4 x 4, sendo quatro fontes de carbono e quatro de nitrogênio, perfazendo um total de 16 tratamentos. Em todos os experimentos foram utilizadas seis repetições por tratamento, sendo cada parcela representada por uma placa de Petri com três colônias.

Foram realizadas cinco avaliações com intervalos de sete dias, quando foram anotadas os seguintes parâmetros: crescimento micelial obtido por meio da medição do diâmetro da colônia, em dois sentidos diametralmente opostos; taxa de crescimento calculada entre as leituras efetuadas aos 7 e 14 dias de incubação conforme Lilly & Barnett (10); e peso seco obtido após a última avaliação, segundo metodologia descrita por Reeslev & Kjoller (16). Os dados obtidos foram transformados com $(x + 0,5)^{1/2}$ e analisados por meio do programa SWNTIA (5). As médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As características culturais foram descritas em função da morfologia e coloração das culturas.

Efeito de diferentes meios de cultura - O crescimento de *M. musicola* foi avaliado em seis meios de cultura: BDA (200g de batata, 20g de dextrose, 1000mL de água destilada), BDA/IFB (BDA acrescido de infuso de 200g de folhas de bananeira), V8 (200mL de suco vegetal V-8 da Campbell Soup Company, USA, 17g de agar, 800mL de água destilada), V8/IFB (V8 acrescido de infuso de 200g de folhas de bananeira), V8/CaCO₃ (V8, 3g de CaCO₃) e V8/CaCO₃/IFB (V8/CaCO₃ acrescido de infuso de 200g de folhas de bananeira).

Foram encontradas diferenças estatísticas significativas quanto ao crescimento micelial e peso seco de *M. musicola* entre os diferentes meios de cultura avaliados (Tabela 1). As maiores médias foram observadas para os meios de cultura BDA/IFB, V8/IFB e BDA, os quais não diferiram estatisticamente entre si. As maiores médias de peso seco obtidas nos meios quando comparadas com as dos meios sem a infusão de folhas de bananeira, sugerem uma influência positiva de sua inclusão, no crescimento do fungo *in vitro*. De fato, decoctos, extratos e sucos oriundos de folhas ou de outras partes vegetais, têm sido apontados como estimuladores do crescimento micelial e a esporulação de vários fungos (4).

Efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio - Foram avaliadas como fontes de carbono a dextrose (D), maltose (M), sacarose (S) e xilose (X), e como fontes orgânicas de nitrogênio a peptona (P) e glicina (G) e inorgânicas o nitrato de potássio (NP) e o de sódio (NS). Foi utilizado como meio de cultura básico (MB) o descrito por Lilly & Barnett (10), tendo sido avaliadas as seguintes combinações: MB/D/P, MB/D/G, MB/D/NP, MB/D/NS, MB/M/P, MB/M/G, MB/M/NP, MB/M/NS, MB/S/P, MB/S/G, MB/S/NP, MB/S/NS, MB/X/P, MB/X/G, MB/X/NP, MB/X/NS.

Não ocorreu interação significativa entre fonte de carbono, nitrogênio e épocas de avaliação. Entretanto, verificaram-se interações significativas para as combinações: fonte de carbono x tempo e fonte de nitrogênio x tempo, indicando que a suplementação dessas fontes no meio de cultura afetaram o crescimento micelial de *M. musicola*. Interação altamente significativa foi observada entre carbono x nitrogênio, tendo sido constatadas as maiores médias de crescimento

Tabela 1. Efeito de diferentes meios de cultura no crescimento micelial e peso seco de *Mycosphaerella musicola*, aos 35 dias de incubação sob condições de alternância luminosa e temperatura de 28°C.

| Meios de cultura | Valor de pH | Taxa de crescimento (mm/dia) | Crescimento radial (mm) | Peso seco (mg) | Correlação de Pearson | |
|--------------------------------|------------------|------------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|--------|
| | | | | | R | PR > F |
| BDA | 5,7 ¹ | 0,41 ² | 8,13 a ³ | 29,35 ab ³ | 0,88* | 0,01 |
| BDA/IFB | 5,7 | 0,47 | 8,80 a | 47,04 a | | |
| V8 | 4,4 | 0,10 | 5,04 b | 10,31 c | | |
| V8/IFB | 4,5 | 0,36 | 8,53 a | 28,64 ab | | |
| V8/CaCO₃ | 6,6 | 0,29 | 6,90 ab | 15,79 bc | | |
| V8/CaCO₃/IFB | 6,5 | 0,22 | 6,39 ab | 16,80 bc | | |
| Coeficiente de variação (%) | | | 13,02 | 21,66 | | |

¹ Valor de pH aferido após autoclavagem à 121°C durante 15 minutos.

² Taxa de crescimento = crescimento aos 14 dias - crescimento aos 7 dias/tempo em dias.

³ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Análise realizada com os dados transformados em $(x + 0,5)^{1/2}$.

* Correlação significativa pelo teste t a 5% de probabilidade.

radial e peso seco para as fontes de carbono, sacarose, maltose e dextrose, quando combinadas com a peptona como fonte de nitrogênio (Tabela 2). O resultado obtido era esperado, uma vez que essas fontes estão entre as mais importantes para o metabolismo dos fungos em geral (2, 6, 8).

A utilização da xilose como fonte de carbono, independente da fonte de nitrogênio, resultou nas menores médias, sugerindo um efeito inibidor desta fonte no crescimento micelial de *M. musicola*. Baixa resposta a xilose também foi observada no crescimento micelial de *Botryodiplodia theobromae* Pat. (11). O insucesso da xilose, como fonte de carbono poderia estar relacionado a sua conformação molecular, a qual dificultaria a assimilação pelo fitopatógeno (1).

Efeito de diferentes valores de pH - Foi avaliada a influência de quatro valores de pH: 6,8; 6,4; 5,7 e 4,9, utilizando-se como meio de cultura o BDA/IFB. Diferenças estatísticas significativas foram observadas para o parâmetro crescimento radial apenas entre os valores de pH 5,7 e 4,9, com a maior média verificada para o primeiro. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos para o parâmetro peso seco, apesar da maior média ter sido constatada também para o pH 5,7.

Efeito de diferentes regimes luminosos - Foi utilizado o meio de cultura BDA/IFB, com pH de 5,7, avaliado sob três regimes luminosos: alternância luminosa (12 h claro/12 h escuro), luz contínua e escuro contínuo. Foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os parâmetros nos regimes luminosos avaliados.

Os melhores resultados foram obtidos para os cultivos mantidos no escuro contínuo e os menores valores médios foram observados para o regime luminoso claro contínuo. Melhor crescimento micelial foi igualmente constatado no regime de escuro contínuo para *Mycosphaerella fijiensis* (7).

Apesar do peso seco ser considerado um parâmetro mais eficiente na avaliação do crescimento de fungos (2), em nosso estudo os valores obtidos mediante a utilização do diâmetro da colônia para medir o crescimento micelial foram compatíveis com os observados para o parâmetro peso seco, e por ser uma metodologia mais simples, pode ser empregada com eficiência em estudos futuros de crescimento de fungos.

Quanto às características culturais das colônias não foram observadas diferenças expressivas entre os experimentos. A coloração do anverso foi sempre preta; a do verso variou do cinza a rosa acinzentado com centro variegado de cinza escuro, branco ou rosa; as bordas apresentaram-se onduladas ou irregulares e os micélios aéreos, densos, com centros elevados em projeções globulares. Maiores variações foram observadas no experimento de fontes de carbono e nitrogênio, que apresentou colônias com coloração do verso preta e micélio submerso, plano e sem forma definida. Diferenças na morfologia das colônias podem ser resultado da influência das condições de cultivo as quais o isolado foi submetido (3, 12).

Com base nos resultados obtidos neste trabalho pode-se recomendar para a indução de um maior crescimento micelial de *M. musicola in vitro*, o acréscimo da infusão de folhas de bananeira ao

Tabela 2. Efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio no crescimento micelial e peso seco de *Mycosphaerella musicola*, aos 35 dias de incubação sob condições de alternância luminosa e temperatura de 28°C.

| Meio de cultura (MB) ¹ acrescido de | Valor de pH | Taxa de crescimento (mm/dia) | Crescimento radial (mm) | Peso seco (mg) | Correlação de Pearson | |
|--|------------------|------------------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|--------|
| | | | | | R | PR > F |
| D/P ² | 5,2 ³ | 0,34 ⁴ | 8,58 a ⁵ | 9,20 bc ⁵ | 0,88 ** | 0,00 |
| D/G | 5,0 | 0,05 | 2,88 b | 5,24 bcd | | |
| D/NP | 5,0 | 0,04 | 2,72 b | 2,21 de | | |
| D/NS | 5,0 | 0,05 | 3,11 b | 2,92 cde | | |
| M/P | 5,3 | 0,18 | 6,58 a | 9,95 ab | | |
| M/G | 5,0 | 0,02 | 2,63 b | 5,39 bcd | | |
| M/NP | 5,0 | 0,07 | 3,65 b | 4,20 bcd | | |
| M/NS | 5,0 | 0,08 | 3,39 b | 4,59 bcd | | |
| S/P | 5,3 | 0,40 | 8,01 a | 18,90 a | | |
| S/G | 5,1 | 0,09 | 3,45 b | 4,26 bcd | | |
| S/NP | 5,1 | 0,05 | 3,06 b | 2,88 cde | | |
| S/NS | 5,0 | 0,04 | 1,19 c | 2,77 de | | |
| X/P | 4,9 | 0,00 | 0,00 d | 0,00 e | | |
| X/G | 4,9 | 0,01 | 0,21 d | 0,18 e | | |
| X/NP | 4,8 | 0,00 | 0,00 d | 0,00 e | | |
| X/NS | 4,8 | 0,00 | 0,39 cd | 0,24 e | | |
| Coeficiente de variação (%) | | | 10,77 | 27,78 | | |

¹ MB – meio básico Lilly & Barnett (1951).

² D – Dextrose; M – Maltose; S – Sacarose; X – Xilose; P – Peptona; G – Glicina; NP – Nitrato de Potássio e NS – Nitrato de Sódio.

³ Valor de pH aferido após autoclavagem à 121°C durante 15 minutos.

⁴ Taxa de crescimento = crescimento aos 14 dias – crescimento aos 7 dias/tempo em dias.

⁵ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Análise realizada com os dados transformados em $(x + 0,5)^{1/2}$.

** Correlação altamente significativa pelo teste t a 5% de probabilidade.

meio de cultura BDA com o subsequente ajuste do valor final do pH para 5,7 e cultivo sob regime de escuro contínuo. O crescimento micelial também poderá ser favorecido com o acréscimo de sacarose, maltose ou dextrose, como fontes de carbono combinadas com peptona, como fonte de nitrogênio.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à FACEPE pelo financiamento da pesquisa e concessão da bolsa de fixação de pesquisadora a primeira autora, bem como ao Dr. Elton Oliveira dos Santos pela cessão dos materiais biológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chaturvedi, C. Nutritional studies on *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. **Mycopathologia et Mycologia**, v. 27, p. 265-272, 1965.
2. Cochrane, V.W. **Physiology of fungi**. New York: John Wiley & Sons Inc., 1958. 524 p.
3. Cordeiro, Z.J.M.; Matos, A P de. Impact of *Mycosphaerella* spp in Brazil. In: Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San Jose, 2002, Costa Rica. **Mycosphaerella leaf spot diseases of bananas: present status and outlook**. Montpellier: INIBAP, 2003. p. 91-97.
4. Dhingra, O.D.; Sinclair, J.B. **Basic Plant Pathology Methods**. Florida: CRC Press, 1985. 434 p.
5. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa Tecnológica em Informática para a Agricultura. **SWNTIA, versão 4.2.1. Instalação e Programa**. Campinas: Embrapa CNPTIA, 1996. 3 v. disquete.
6. Griffin, D.H. **Fungal physiology**, 2 ed, New York: Wiley-Liss, Inc., 1993. 458 p.
7. Hanada, R.E.; Gasparotto, L.; Pereira, J.C.R. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 170-173, 2002.
8. Hawker, L.E. **Physiology of fungi**. London: University of London, 1950. 350 p.
9. Jones, D.R. The distribution and importance of the *Mycosphaerella* leaf spot diseases of banana. In: Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San Jose, 2002, Costa Rica. **Mycosphaerella leaf spot diseases of bananas: present status and outlook**. Montpellier: INIBAP, 2003. p. 25-41.
10. Lilly, V.G.; Barnett, H.C. **Physiology of the fungi**. New York: McGraw-Hill, 1951. 464 p.
11. Lima, J.A.S. **Caracterização patogênica, fisiológica, cultural e isoesterásica de isolados de *Botryodiplodia theobromae* Pat., agente causal da morte descendente da mangueira (*Mangifera indica* L.)**. 1996. 128 f. Tese (Mestrado em Agronomia-Fitossanidade) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
12. Meredith, D.S. **Banana Leaf Spot Disease (Sigatoka) caused by *Mycosphaerella musicola* Leach**. Kew, Surrey, UK: Commonwealth Mycological Institute, 1970. 147 p. (Phytopathological Papers, n. 11).
13. Morais, S.A.; Salgado, C.L. Influência da luz sobre a esporulação de *Cercospora arachidicola* Hori. **Summa Phytopathologica**, v. 4, n. 2, p. 128-135, 1978.
14. Nagel, C.M. Conidial production in species of *Cercospora* in pure culture. **Phytopathology**, v. 24, p. 1101-1110, 1934.
15. Pereira, J.C.R.; Gasparotto, L.; Coelho, A.F.S.; Vêras, S. de M. **Doenças da Bananeira no Estado do Amazonas**, 3ª edição revisada, Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2003. 12 p. (Circular Técnica, n. 20).
16. Reeslev, M.; Kjoller, A. Comparison of biomass dry weights and radial growth rates of fungal colonies on media solidified with different gelling compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 1, n. 12, p. 4236-4239, 1995.