

Meios de cultura semi-seletivos para *Macrophomina phaseolina*

Selma Rogéria de Carvalho Nascimento, Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio, Fernando Henrique Alves da Silva, Louise Medeiros Silva Guimarães

Departamento de Ciências Vegetais, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal Rural do Semiárido, 59.625-900, Mossoró, RN, Brasil.
Autores para correspondências: Selma Rogéria de Carvalho Nascimento (selma@ufersa.edu.br) e Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio (marciamichelle@ufersa.edu.br)
Data de chegada: 06/06/2014. Aceito para publicação em: 31/11/2014.

10.1590/0100-5405/2014

RESUMO

Nascimento, S.R.C.; Ambrósio, M.M.Q.; Silva, F.H.A.; Guimarães, L.M.S. Meios de cultura semi-seletivos para *Macrophomina phaseolina*. *Summa Phytopathologica*, v.40, n.4, p.334-337, 2014.

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goidanich é um fungo habitante do solo importante economicamente devido ao amplo número de espécies de plantas que infectam e da dificuldade do seu controle. Vários estudos envolvendo densidade de inóculo, taxonomia, sobrevivência, necessitam de meios de cultura seletivo ou semi-seletivo. O objetivo do trabalho foi avaliar 16 meios de cultura quanto à especificidade a este patógeno, proporcionando maior porcentagem de detecção do seu crescimento e menor número de contaminações, para substituir o meio semi-seletivo RB modificado, rotineiramente utilizado em estudos deste patógeno. O meio semi-seletivo RB modificado é bastante eficiente e contém em sua composição o fungicida metalaxyl (inibidor de oomycetos), que atualmente não se encontra disponível comercialmente em formulação simples, sem adição do Mancozeb ou Chlorotalonil que inibem o crescimento do fungo *M. phaseolina*. Os meios de cultura avaliados foram repicados com o inóculo do fungo produzido em substrato areno-orgânico, contido em bolsas de náilon,

recuperados após 30 dias de um solo não autoclavado, contido em uma bandeja. Cada meio de cultura avaliado tiveram 7 repetições, representadas por uma placa de Petri. Para as comparações das médias das porcentagens do crescimento de *M. phaseolina* e do número de contaminantes foi utilizado o teste de Scott-knott a 5% de probabilidade e os valores em porcentagem foram transformados em arc sen ($\sqrt{x/100}$). Dentre os meios de cultura avaliados os MSTP 1 [(BDA com tetraciclina 50 mg.L⁻¹ mais propamocarb a 1 mL.L⁻¹ (Previcur N[®] 72,2% p.a.)], MSRP 0,5 (BDA com rifampicina 100 mg.L⁻¹ mais fungicida propamocarb a 0,5 mL.L⁻¹) e MSRP 1 (BDA com rifampicina 100 mg.L⁻¹ mais fungicida propamocarb a 1 mL.L⁻¹) proporcionaram maior porcentagem e detecção do fungo *M. phaseolina* e menor número de contaminações por outros fungos e bactérias. Estes meios de cultura semi-seletivos podem ser utilizados em futuros trabalhos visando estudos epidemiológicos e de medidas de controle do fungo *M. phaseolina*.

Palavras-chave adicionais: meio de cultura RB, rifampicina, tetraciclina, propamocarb, fosetil

ABSTRACT

Nascimento, S.R.C.; Ambrósio, M.M.Q.; Silva, F.H.A.; Guimarães, L.M.S. Semi-selective culture media for *Macrophomina phaseolina*. *Summa Phytopathologica*, v.40, n.4, p.334-337, 2014.

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goidanich is a soil-borne fungus that is economically important due to the large number of plant species it infects and to its difficult control. Several studies involving inoculum density, taxonomy and survival require selective or semi-selective culture media. The aim of this study was to evaluate 16 culture media for their specificity to this pathogen, providing greater growth detection percentage and less contamination, in order to substitute the modified semi-selective medium RB, routinely used in studies with this pathogen. The modified semi-selective culture medium RB is highly efficient and contains in its composition the fungicide metalaxyl (oomycete inhibitor), which is not currently available for commercialization in its simple formularization, without the addition of Mancozeb or Chlorothalonil, which inhibit the growth of *M. phaseolina*. The evaluated culture media were transferred with the fungal inoculum produced

in sandy organic substrate, contained in nylon bags, and recovered after 30 days from non-sterilized soil on a tray. Each evaluated culture medium had 7 replicates, represented by one Petri dish. For comparison of means of *M. phaseolina* growth percentages and number of contaminants, Scott-Knott test at 5% probability was used and percentage values were transformed into arc sen ($\sqrt{x/100}$). Among the evaluated culture media, MSTP 1 [(PDA with tetracycline 50 mg.L⁻¹ plus propamocarb 1 mL.L⁻¹ (Previcur N[®] 72.2% pa)], MSRP 0.5 (PDA with rifampicin 100 mg.L⁻¹ plus the fungicide propamocarb 0.5 mL.L⁻¹) and MSRP 0.1 (PDA with rifampicin 100 mg.L⁻¹ plus propamocarb 1 mL.L⁻¹) resulted in greater percentage of detection of the fungus *M. phaseolina* and less contamination by other fungi and bacteria. These semi-selective culture media can be used in future research for epidemiological studies and control measures against the fungus *M. phaseolina*.

Additional keywords: culture medium RB, rifampicin, tetracycline, propamocarb, fosetyl

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goidanich é um fungo habitante do solo que vem se destacando de forma crescente e causando perdas econômicas no mundo inteiro (5). Infecta mais de 500 espécies de plantas em mais de 100 famílias botânicas, causando podridão de raiz

e caule (6, 11).

Metodologias que permitam trabalhar e avaliar esse patógeno são importantes na geração de conhecimentos sobre esse microrganismo e na busca de novas alternativas para seu controle (3). Neste contexto,

meios de cultura que ajude de forma consistente nas pesquisas sobre densidade de inóculo, dinâmica populacional, taxonomia e sobrevivência de patógenos veiculados pelo solo, sendo ainda, seletivo quando o microrganismo alvo é isolado de um vasto número de microrganismos do solo, são sempre muito bem vindos (12). Porém, a eficiência de um meio de cultura pode ser variável devido às diferenças na população microbiana do solo (4). Alguns meios têm sido relatados como seletivos a *M. phaseolina* (4; 8; 9). Por exemplo, o meio de cultura RB (39 g de BDA, 100 mg de rifampicina, 224 mg a.i de metalaxyl e 1,0 mL de tergitol NP-10), desenvolvido por Cloud & Rupe (4) é bastante eficiente na detecção de *M. phaseolina* do solo. Entretanto, o fungicida metalaxyl, que é essencial na composição desse meio por inibir o crescimento dos oomicetos, deixou de ser comercializado em formulação simples sem os fungicidas Mancozeb ou Clorotalonil. Estes dois fungicidas adicionados ao metalaxil inibem o fungo *M. phaseolina*. Diante disso, o objetivo do trabalho foi desenvolver novos meios de cultura semi-seletivos eficientes para a recuperação do fungo *M. phaseolina* do solo.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório de Microbiologia e Fitopatologia do setor de Fitossanidade do Departamento de Ciências Vegetais (DCV), da Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA.

Obtenção do inóculo de *M. phaseolina*

O isolado do fungo *M. phaseolina* foi obtido de plantas de feijão caupi (*Vigna unguiculata* L.) com sintomas de podridão cinzenta do caule e teve a sua patogenidade comprovada através de teste prévio utilizando metodologia do palito de dente infectado (10).

Preparo do inóculo de *M. phaseolina*

O isolado de *M. phaseolina* foi repicado para placas de Petri contendo meio de cultura BDA + tetraciclina ($0,05\text{g.L}^{-1}$) e mantido a 28 ± 1 °C, no escuro, em estufa tipo BOD por 6 dias, para proporcionar o crescimento fúngico. Em câmara asséptica foram retirados discos de 7 mm de diâmetro das bordas das colônias do fungo e transferidos cinco discos para frascos de capacidade de 1000 mL, contendo 500 mL de substrato areno-orgânico autoclavado três vezes, em intervalos de 24 horas durante uma hora a 121 °C. O substrato consistiu de 3 partes de esterco de curral curtido, uma parte de areia lavada e 2 % de aveia (V/P), aos quais foram adicionados 20 mL de água destilada para cada 100 mL de substrato (7).

Após as repicagens do fungo para o substrato areno-orgânico, devidamente esterilizado, os frascos foram mantidos em estufa tipo BOD, a 28 ± 1 °C, no escuro, por 15 dias, e foram agitados, duas vezes ao dia, com o objetivo de homogeneizar a infestação. Foi mantido um frasco em laboratório, contendo o substrato sem o fungo, nas mesmas condições dos demais para servir como referencial de possíveis contaminações. Após este tempo de incubação, o substrato contendo o fungo foi colocado em tecido sintético (náilon) e amarrado em forma de bolsa com linha náilon e enterrado no solo contido em uma bandeja a profundidade de 10 cm. Foi confeccionada uma bolsa para cada meio de cultura a ser avaliado. As linhas de náilon da amarração ficaram à superfície, para facilitar a retirada das bolsas. Após 30 dias, procedeu-se a retirada das bolsas do solo e desinfestação superficial conforme metodologia de Bueno et al (3).

Especificidade dos meios de cultura para *M. phaseolina*

Para avaliação da especificidade dos meios de cultura desenvolvidos transferiram-se com auxílio de uma pinça, dez porções de 0,6 g aproximadamente cada uma, do substrato contido nas bolsas previamente desinfestadas, para placas de Petri contendo os seguintes meios de cultura:

- 1- MSR BDA com rifampicina 100 mg.L^{-1} (Rifampicina® cápsula. 300 mg)
- 2- MST BDA com tetraciclina 50 mg.L^{-1} (Tetraciclina® - cloridrato de tetraciclina 500 mg);
- 3- MSRT BDA com rifampicina 100 mg.L^{-1} mais tetraciclina 50 mg.L^{-1} ;
- 4- MSRP 0,5 BDA com Rifampicina 100 mg.L^{-1} mais fungicida propamocarb a $0,5\text{ mL.L}^{-1}$; (Previcur N® 72,2% pa.)
- 5- MSRP 1 BDA com rifampicina 100 mg.L^{-1} mais fungicida propamocarb a 1 mL.L^{-1} ;
- 6- MSRP 2 BDA com rifampicina 100 mg.L^{-1} mais fungicida propamocarb a 2 mL.L^{-1} ;
- 7- MSRF 0,5 BDA com rifampicina 100 mg.L^{-1} mais fosetil a $0,5\text{ g.L}^{-1}$ (Aliette® 80% pa.);
- 8- MSRF 1 BDA com rifampicina 100 mg.L^{-1} mais fosetil a 1 g.L^{-1} ;
- 9- MSTP 0,5 BDA com tetraciclina 50 mg.L^{-1} mais propamocarb a $0,5\text{ mL.L}^{-1}$
- 10- MSTP 1 BDA com tetraciclina 50 mg.L^{-1} mais propamocarb a 1 mL.L^{-1} ;
- 11- MSTP 2 BDA com tetraciclina 50 mg.L^{-1} mais propamocarb a 2 mL.L^{-1} ;
- 12- MSTF 0,5 BDA com tetraciclina 50 mg.L^{-1} mais fosetil a $0,5\text{ g.L}^{-1}$;
- 13- MSTF 1 BDA com tetraciclina 50 mg.L^{-1} mais fosetil a 1 g.L^{-1} ;
- 14- MSTRP 0,5 BDA com tetraciclina 50 mg.L^{-1} mais rifampicina 100 mg.L^{-1} mais propamocarb a $0,5\text{ mL.L}^{-1}$;
- 15- MSTRF 0,5 BDA com tetraciclina 50 mg.L^{-1} mais rifampicina 100 mg.L^{-1} mais fosetil a $0,5\text{ g.L}^{-1}$ e
- 16- RB m BDA com metalaxyl 224 mg (Ridomil 2E-G) mais rifampicina 100 mg.L^{-1} (Meio de cultura RB modificado) (1; 2).

As placas de Petri contendo os meios de cultura semi-seletivos com o inóculo foram mantidas em estufa tipo BOD, no escuro, a 28 ± 1 °C por 6 dias para proporcionar o crescimento do micélio do fungo em torno da porção plaqueada, bem como o aparecimento de contaminantes.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado e cada um dos 16 meios de cultura tiveram 7 repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri contendo 10 porções do substrato infestado com o fungo *M. phaseolina*.

A avaliação do experimento foi realizada através do cálculo da porcentagem das porções do substrato que proporcionaram o desenvolvimento do fungo *M. phaseolina* transformadas em arc sen ($\sqrt{x/100}$) e do número dos contaminantes de cada placa. As médias foram analisadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os meios de cultura avaliados, os que propiciaram os maiores percentuais de detecção do fungo *M. phaseolina* foram MSRP 1, MSTP 1 e 2, MSRT 0,5, RB modificado e MSRP 05 não diferindo estatisticamente entre si (Tabela 1). Ao analisar tanto a maior porcentagem de detecção do fungo *M. phaseolina*, quanto o menor número de contaminantes, ao mesmo tempo, os melhores meios de cultura foram os MSTP1, MSRP 0,5 e 1. Estes meios, nestas condições, foram superiores ao meio de cultura RB modificado (Tabela 1).

Não houve diferença estatística entre os meios de cultura que receberam somente os antibióticos rifampicina e tetraciclina, MSR e

MST. Estes meios foram os que apresentaram os menores percentuais de detecção de *M. phaseolina* e maior número de contaminações (Tabela 1).

Os fungicidas propamocarb e fosetil são inibidores de oomicetos e atuam na síntese de proteína e metabolismo do ácido nucléico, igualmente ao fungicida Metalaxyl, componente do meio de cultura RB modificado, utilizado em trabalhos que avaliaram a sobrevivência do fungo *M. phaseolina* (1; 2). Segundo os dados do presente trabalho (Tabela 1 e Figura 1), o fungicida propamocarb demonstrou ser melhor que o fosetil, nos meios semi-seletivos para *M. phaseolina*.

Zveibil et al. (13) em seus estudos com o fungo *M. phaseolina* utilizaram um meio semi-seletivo para isolamento do fungo de tecido vegetal doente e contagem de inóculo do solo, com base no meio de Mathur, semi-seletivo para *Colletotrichum* spp., contendo 0,1% de extrato de levedura, 0,1% de peptona bacteriológica, 1% de sacarose, 0,25% MgSO₄·7H₂O, 0,27% KH₂PO₄, 2% de ágar e Rosa Bengala a 90 mg.L⁻¹, suplementado após autoclavagem com iprodione 2.5 mg (i.a).L⁻¹ (Rovral 50% WP; Rhone Poulenc, Lyon, França), cloranfenicol 250 mg.L⁻¹, dihidroestreptomicina 250 mg.L⁻¹, e o ácido láctico a 0,1%. Este meio de cultura contém mais reagentes em sua constituição e dois antibióticos, sendo, portanto, mais caro e de difícil preparo quando comparados aos meios MSTP 1, MSRP 0,5 e 1 que foram eficientes quanto à especificidade ao fungo *M. phaseolina*.

Conclui-se, então que os meios de cultura semi-seletivos MSTP 1, MSRP 0,5 e 1 podem ser utilizados em futuros trabalhos visando estudos epidemiológicos e de controle do fungo *M. phaseolina*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ambrósio, M.M.Q.; Bueno, C.J.; Souza, N.L. Sobrevivência de *Macrophomina phaseolina* em solo incorporado com brócolos seguido de solarização. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 3, p. 364-370, 2004.
- Ambrósio, M.M.Q.; Bueno, C.J.; Padovani, C.R.; Souza, N.L. Controle de fitopatógenos do solo com materiais vegetais associados à solarização. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.34, n.4, p.354-358, 2008.
- Bueno, C.J.; Ambrósio, M.M.Q.; Souza, N.L. Production and evaluation of survival of resistance structures of soilborne phytopathogenic fungi. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.1, p.47-55, 2007.
- Cloud, G.L.; Rupe, J.C. Comparison of three media for enumeration of sclerotia of *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, St. Paul, v.75, n.8, p.771-772, 1991.
- Kaur, S.; Dhillon, G.S.; Brar, S.K.; Vallad, G.E.; Chauhan, V.B.; Chand, R. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. **Critical Reviews Microbiology**, Manchester, v.38, n.2, p.136-151, 2012.
- Kunwar, L.K.; Singh, T.; Machado, C. C.; Sinclair, J.B. Histopathology of soybean seed and seedling infection by *Macrophomina phaseolina*. **Phytopathology**, St. Paul, v.76, p.532-535, 1986.
- Lefèvre, A.F.; Souza, N.L. Determinação da temperatura letal para *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* e efeito da solarização sobre a temperatura do solo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.19, n.2, p.107-112, 1993.
- Meyer, W.A.; Sinclair, J.B.; Khare, M.N. Biology of *Macrophomina phaseoli* in soil studied with selective media. **Phytopathology**, St. Paul, v.63, p.613-620, 1973.
- Mihail, J.D.; Alcorn, S.M. Quantitative recovery of *Macrophomina phaseoli* in soil studied with selective media. **Plant Disease**, St. Paul, v.66, p.662-663, 1982.
- Nascimento, S.R.; Kurozawa, C.; Maringoni, A.C. Efeito de métodos de inoculação, tipos de substrato e concentrações de inóculo na severidade dos sintomas de podridão radicular de Fusarium em feijoeiro. **Summa phytopathologica**, Jaguariúna, v.25, n.3, p.209-214, 1999.
- Saleh, A.A.; Ahmed, H.U.; Todd, T.C.; Travers, S.E. Related nest of *Macrophomina phaseolina* isolates from tall grass prairie, maize, soybean and sorghum. **Molecular Ecology**, Malden, v.19, n.1, p. 79-91, 2010.

Tabela 1. Porcentagem de crescimento de *Macrophomina phaseolina* e número de contaminações na determinação da especificidade de meios de cultura.

Meios de cultura	Crescimento (%) de <i>M. Phaseolina</i> ²	Número de contaminantes
MSR	37,45 d ¹	6,7 c
MST	37,94 d	7,1 c
MSRT	80,92 b	4,3 b
MSRP 0,5	84,80 a	1,4 a
MSRP 1	90,00 a	3,0 a
MSRP 2	62,96 c	8,6 d
MSRF 0,5	62,38 c	4,6 b
MSRF 1	56,07 c	3,6 b
MSTP 0,5	72,35 b	3,8 b
MSTP 1	90,00 a	1,4 a
MSTP 2	90,00 a	4,6 b
MSTF 0,5	69,37 b	5,1 b
MSTF 1	76,53 b	2,8 a
MSRTP 0,5	90,00 a	8,6 d
MSRTF 0,5	77,50 b	2,4 a
RB m	90,00 a	4,1 b
CV%	17,30	36,8

¹Médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-knott a 5% de probabilidade.

²Os valores em porcentagem foram transformadas em arc sen ($\sqrt{x/100}$). MSR= meio seletivo com rifampicina; MST= meio seletivo com tetraciclina; MSRT= meio seletivo com rifampicina e tetraciclina; MSRP 0,5; 1 e 2 = meio seletivo com rifampicina e propamocarb 0,5; 1 e 2 mL.L⁻¹; MSRF 0,5 e 1 = meio seletivo com rifampicina e fosetil 0,5 e 1 g.L⁻¹; MSTP 0,5; 1 e 2 = meio seletivo com tetraciclina e propamocarb 0,5; 1 e 2 mL.L⁻¹; MSTF 0,5 e 1 = meio seletivo com tetraciclina e fosetil 0,5 e 1 g.L⁻¹; MSRTP 0,5= meio seletivo com rifampicina, tetraciclina e propamocarb 0,5 mL.L⁻¹; MSRTF 0,5= meio seletivo com rifampicina, tetraciclina e fosetil 0,5 g.L⁻¹; RB m= meio de cultura RB modificado.

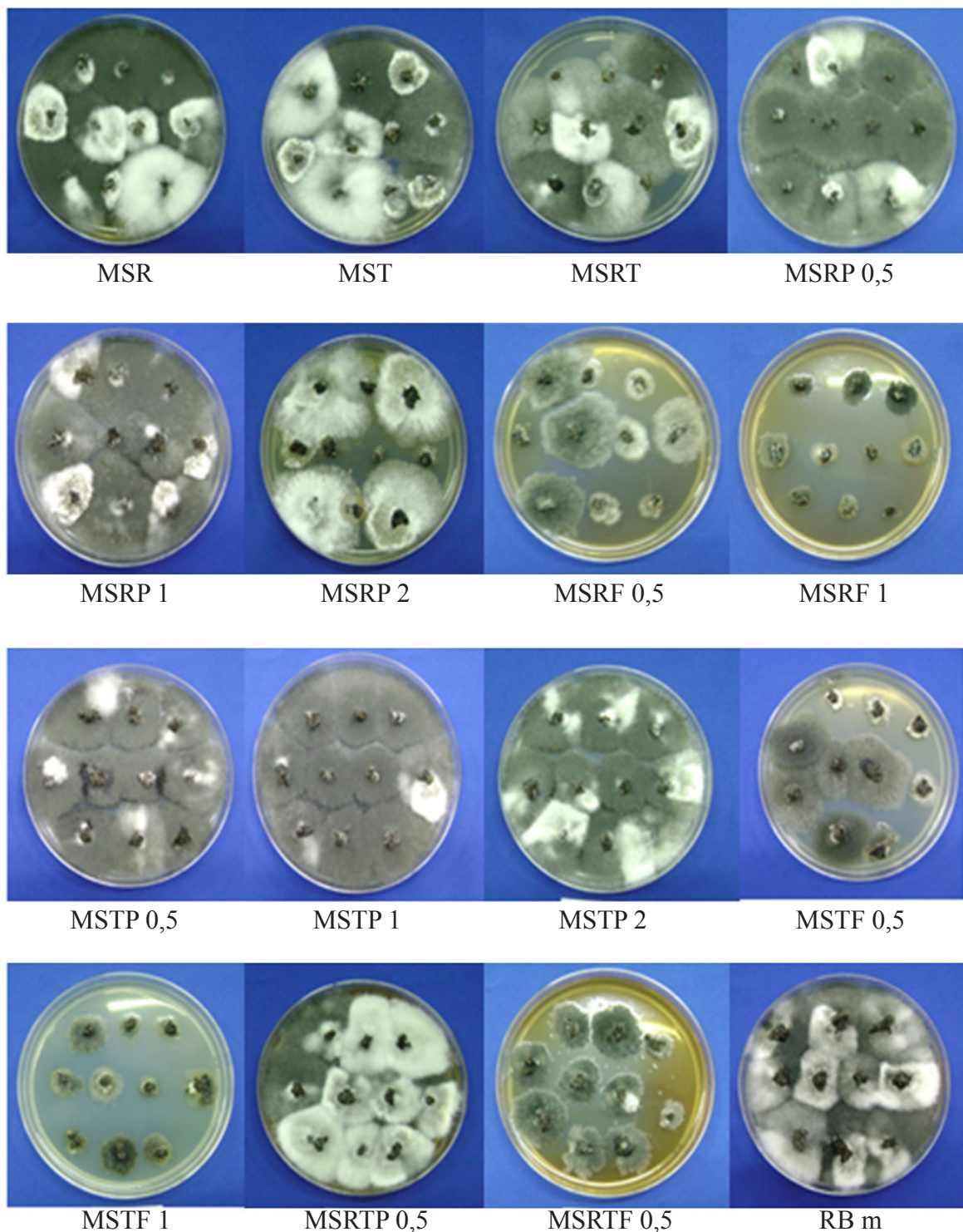


Figura 1. MSR= meio seletivo com rifampicina; MST= meio seletivo com tetraciclina; MSRT= meio seletivo com rifampicina e tetraciclina; MSRP 0,5; 1 e 2= meio seletivo com rifampicina e propamocarb 0,5; 1 e 2 mL.L⁻¹; MSRF 0,5 e 1= meio seletivo com rifampicina e fosetil 0,5 e 1 g.L⁻¹; MSTP 0,5; 1 e 2= meio seletivo com tetraciclina e propamocarb 0,5; 1 e 2 mL.L⁻¹; MSTF 0,5 e 1; meio seletivo com tetraciclina e fosetil 0,5 e 1 g.L⁻¹; MSRTP 0,5= meio seletivo com rifampicina, tetraciclina e propamocarb 0,5 mL.L⁻¹; MSRTF 0,5= meio seletivo com rifampicina, tetraciclina e fosetil 0,5 g.L⁻¹; RB m= meio RB modificado

12. Tsao, P.H. Selective media for isolation of pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.8, p.157-186, 1970.

13. Zveibil, A.; Mor, N.; Gnayem, N.; Freeman, S. Survival, host-pathogen interaction, and management of *Macrophomina phaseolina* on Strawberry in Israel. **Plant Disease**, St. Paul, v.96, n.2, p.265-272, 2012.