

DESENVOLVIMENTO MICELIAR DE *Colletotrichum lindemuthianum* RAÇA 81 EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE LUMINOSIDADE.

GUILHERME NEUENFELD HELBIG¹; HENRIQUE BORGES BARBOSA²;
VIVIANA GAVIRIA-HERNÁNDEZ³; CANDIDA RENATA JACOBSEN DE FARIAS⁴

¹ Curso de graduação em Agronomia, UFPel– quinbig@hotmail.com

² Curso de graduação em Agronomia, UFPel– Henrique_barbosa99@hotmail.com

³ Programa de Pós-graduação em Fitossanidade UFPel – vgaviriah@gmail.com

⁴Depto. De Fitossanidade /FAEM- UFPel– jacobse.candida@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) constitui uma cultura de importância sócio econômico no mundo, devido que representa uma fonte nutricional e proteica (PONPEU, 1987). O Brasil destaca-se como o segundo maior consumidor (19%), e como o terceiro maior produtor de feijão após a Myanmar e a Índia (FAOSTAT, 2015; FAOSTAT, 2014).). Pese a importância da cultura no Brasil, perdas na produtividade acontecem devido a ocorrência de doenças fúngicas, destacando-se a antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (BARBOSA; GONZAGA, 2012; MANOS; OLIVEIRA, MARTINS, 2013).

A antracnose do feijoeiro é uma doença que pode atingir todos os estágios de desenvolvimento da planta, ocasionando danos severos em plântulas, folhas, caule, ramos, vagens e/ou sementes (RAVA et al, 1994) com perdas que podem ser de até 100% da produção em condições favoráveis para a doença (PASTOR-CORRALES; TU, 1989; BALARDIN, 1997). Devido à importância da doença, estudos relacionados com a fisiologia do fungo e pesquisas sobre métodos de controle químicos, biológicos ou genéticos são relevantes para o combate da doença. Esses estudos envolvem na maioria das vezes o cultivo in vitro do patógeno e a produção de inoculo puro em quantidade pré-determinada (SANTOS et al. 2005).

A obtenção de isolados esporulantes de algumas espécies fitopatogênicas torna-se uma tarefa de difícil execução, sendo necessária a padronização das condições ambientais para a esporulação dos mesmos (CRUZ; PRESTES; MACIEL, 2009). Nesse contexto, a espécie *C. lindemuthianum* tem-se caracterizado por ser um fungo de crescimento lento e que, dependendo do isolado, depende de meios suplementados e diferentes condições de luminosidade para a produção de esporos em quantidade suficientes usadas para as pesquisas.

Fatores como a composição do meio de cultura, temperatura e luminosidade são determinantes para a quantidade e qualidade do crescimento micelial e esporulação dos fitopatógenos (DHINGRA; SINCLAIR, 1995; NOZAKI et al, 2004). Condições de luminosidade pode influir na germinação de conídios, taxa de crescimento vegetativo, indução da formação de estruturas reprodutivas, pigmentação, forma e tamanho de grande parte das espécies fúngicas (TEIXEIRA et al., 2001; SANTOS et al, 2005). Dessa forma o objetivo do presente trabalho foi testar diferentes meios de cultura e condições de luminosidade no desenvolvimento in vitro da raça 81 de *C. lindemuthianum*

2. METODOLOGIA

O isolado fúngico de *C. lindemuthianum* pertence a coleção do LPSFF, FAEM-UFPEL, coletado em Seberi, região central do estado do Rio Grande do Sul, sendo obtido de vagens de feijão, e identificado a nível de raça como 377. Preservados em meio Mathur a -5°C , reativados cinco dias antes das instalações dos experimentos.

Para verificar o efeito dos meios de culturas e condições de luminosidade sob o desenvolvimento do fungo, foram avaliados diâmetro da colônia e índice de crescimento micelial. Os experimentos serão conduzidos em delineamento inteiramente casualizado em esquema bifatorial com 4 repetições. Fator A será testado o tipo de meio de cultura e o fator B as condições de luminosidade.

Para isso, o isolado da raça 81 de *C. lindemuthianum* foi repicado para os diferentes meios de culturas Mathur, BDA, Agar Agar (AA), Mathur suplementado com infusão de vagem de feijão (MMV), Batata dextrose Agar (BDA) suplementado com infusão de vagem de feijão (BDAV) e AA suplementado com infusão de vagem de feijão (AAV). Os meios foram vertidos para placas de Petri em câmara de fluxo laminar sendo utilizado 10 mL por placa. No centro de cada placa foi acondicionado um disco de 5mm de diâmetro do isolado. Posteriormente, as placas serão submetidas a diferentes condições de luminosidade: 12h luz e 12h escuros, 12h luz por 5 dias + 24 horas escuros por sete dias a temperatura de 23°C . Para suplementar os meios Mathur, Agar Agar e BDA com vagem de feijão, 500g de vagens de feijão paulista, previamente desinfestadas com hipoclorito 1% foram cortadas em cúbitos para serem fervidas por 10 minutos em 500 ml de água. Posteriormente a infusão foi filtrada e completou-se o volume com água destilada até 1L e cada meio foi adicionado conforme as indicações da bula.

A partir do terceiro dia após a repicagem, foi realizada a medição diária do diâmetro da colônia com o auxílio de um paquímetro digital, levando-se em consideração a média de dois diâmetros ortogonais das colônias em desenvolvimento, até o decimo segundo dia de crescimento. A partir dos dados correspondentes ao último dia de avaliação será avaliado o diâmetro final das colônias. Os valores obtidos das medições diárias das colônias serão utilizados para o cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial de acordo com Oliveira (1991); $\text{IVCM} = \sum (D-DA) / N$, onde IVCM = Índice de velocidade de Crescimento Micelial, D= Diâmetro médio atual da colônia, DA= Diâmetro médio da colônia do dia anterior, N= número de dias após a inoculação

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, à homocedasticidade pelo teste de Hartley e a independência dos resíduos foi verificada graficamente. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tanto para a variável de IVCM como de Diâmetro final da colônia, não ocorreu interação dentre os fatores meios de cultura e luminosidade. Dessa forma procedeu-se comparar os meios de cultura, separadamente de cada condição de luminosidade pelo teste de comparação de medias de Tukey ($p \leq 0,05$). Na condição de luminosidade 12/12, os meios Mathur suplementado com vagem (MV) e Agar agar suplementado com vagem (AAV) apresentaram maior índice de velocidade de crescimento micelial IVCM em relação a esses mesmos meios sem vagem, Mathur (M) e Agar Agar (AA) (Tabela 1). Destacou-se que o a velocidade

de crescimento do fungo foi maior no meio BDA que no meio BDA suplementado com vagem (BDAV). O Meio Agar Agar, para ambas as condições de luminosidade aprestou os menores IVCM comparado com os outros meios de cultura, o que indica que o patógeno precisa de meios com maior quantidade de sais e nutrientes para conseguir desenvolver sua fase vegetativa.

Tabela 1. Índice de velocidade de crescimento micelial (cm) de *C. lindemuthianum* raça 81 quando submetido a diferentes meios de cultura em condições 12 h luz 12 h escuro e condições

| Tipos de Meios de cultura | Condições de Luminosidade | | | |
|---------------------------|---------------------------|------------------|------------|---|
| | Luz 12/12 | | Luz/escuro | |
| M | 0.53 | ab ^{1/} | 0.44 | b |
| BDA | 0.52 | ab | 0.45 | b |
| AA | 0.02 | c | 0.04 | c |
| MV | 0.57 | a | 0.57 | a |
| BDAV | 0.44 | b | 0.47 | b |
| AAV | 0.63 | a | 0.64 | a |

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra na coluna, comparando os tipos de meio de cultura para a condição de luminosidade 12/12, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). ^{2/} Médias acompanhadas por mesma letra na coluna, comparando os tipos de meio de cultura para a condição de luminosidade luz/escuro, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Também pode-se dizer que o substrato suplementado com vagem não foi essencial para o crescimento, como exemplo os meios de cultura Mathur e BDA, foram estatisticamente similares em relação a variável de IVCM quando comparado como os meios suplementados. No entanto, foi evidente que a infusão de feijão adicionada em todos os meios para ambas as condições de luminosidade aumentou o a velocidade de crescimento do fungo.

Em relação ao diâmetro final da colônia, na condição de luminosidade 12/12 no meio Agar Agar suplementado com vagem (AAV) e o meio Mathur suplementado com vagem (MV), o fungo apresentou maior diâmetro de crescimento micelial (DCM) (Tabela 2). Para a condição Luz/escuro, a variável DCM foi estatisticamente maior para o meio AAV seguido pelo meio Mathur suplementado, concordando esses os resultados com o IVCM, devido que a maior índice de crescimento micelial o fungo terá provavelmente maior diâmetro total da colônia.

No meio Agar Agar, o fungo apresentou pouco crescimento micelial. Esse meio se caracteriza por ser pobre em sais e açúcares, elementos nutricionais essenciais para crescimento de fungos exigentes como *C. lindemuthianum*.

Tabela 2. Diâmetro da colônia (cm) de *C. lindemuthianum* raça 81 quando submetido a diferentes meios de cultura em condições 12 h luz 12 h escuro e condições

| Tipos de Meios de cultura | Condições de Luminosidade | | | |
|---------------------------|---------------------------|------------------|------------|-----------------|
| | Luz 12/12 | | Luz/escuro | |
| M | 5.24 | bc ^{3/} | 4.69 | c ^{4/} |
| BDA | 4.79 | cd | 4.55 | c |
| AA | 0.83 | e | 0.82 | d |
| MV | 5.80 | ab | 5.49 | b |
| BDAV | 4.43 | d | 4.46 | c |
| AAV | 6.11 | a | 5.92 | a |

^{3/} Médias acompanhadas por mesma letra na coluna, comparando os tipos de meio de cultura para a condição de luminosidade 12/12, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). ^{4/} Médias acompanhadas por mesma letra na coluna, comparando os tipos de meio de cultura para a condição de luminosidade luz/escuro, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Segundo Meneses e Silva-Hanlin (1997) metabolitos específicos a cada espécie fúngica estão envolvidos no melhor desenvolvimento do fungo em alguns substratos que em outros. Dessa forma destaca-se que quando suplementado o meio AA com vagem, tanto o índice de velocidade de crescimento micelial como o diâmetro final foi estatisticamente maior que os outros meios, sendo evidente a grande especificidade do fungo pelo gênero *Phaseolus*.

4. CONCLUSÕES

O meio Agar Agar e Mathur, ambos suplementados com vagem aumentaram o índice de velocidade de crescimento micelial e diâmetro da colônia

O crescimento de *C. lindemuthianum* raça 81 não foi estimulado pelo meio Agar Agar, não sendo recomendado o uso do mesmo sem suplementar com outros nutrientes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COELHO, R.M.S., CASTRO, H.A. de. & MENEZES, M. Esporulação de *Phomopsis* e *Phoma* em diferentes meios de cultura e condições de temperatura e luminosidade. Summa Phytopathologica, v.23, p176-180, 1997.

MENEZES, M.; SILVA-HANLIN, D. M. W. Guia prático para fungos fitopatogênicos. Recife: UFRPE, 1997. 106 p

PADDER, B.A.; SHARMA, P.N.; AWALE, H.E.; KELLY, J.D. *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. Journal of Plant Pathology, v.99, n.2, p.317-330, 2017

RAVA, C.A., PURCHIO, A.F. & SARTORATO, A. Caracterização de Patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorreram em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. Fitopatologia Brasileira, v.19, p167-172, 1994..