

Boletim de Pesquisa 66

e Desenvolvimento ISSN 1676 - 1340

Setembro 2004

**Desenvolvimento de metodologia para cultivo do
fungo *Cercospora caricis*, agente de biocontrole de
*Cyperus rotundus***



República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

José Amauri Dimázio
Presidente

Clayton Campanhola
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Dietrich Gerhard Quast
Sérgio Fausto
Urbano Campos Ribeiral
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Clayton Campanhola
Diretor-Presidente

Gustavo Kauark Chianca
Herbert Cavalcante de Lima
Mariza Marilena T. Luz Barbosa
Diretores-Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Souza Dias
Chefe -Geral

Maurício Antonio Lopes
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteado
Chefe-adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes
Chefe-Adjunto de Administração

**Boletim de Pesquisa
e Desenvolvimento 66**

**Desenvolvimento de metodologia
para cultivo do fungo *Cercospora
caricis*, agente de biocontrole de
*Cyperus rotundus***

Sueli C. M. de Mello
Zilá R. de Ávila
Carlos R. Borges Neto

Brasília, DF
2004

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria Alice Bianchi

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Alice Bianchi e Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2004): 150 unidades

M 527 Mello, Sueli C. M. de.

Desenvolvimento de metodologia para cultivo do fungo *Cercospora caricis*, agente de biocontrole de *Cyperus rotundus* / Sueli C. M. de Mello, Zilá R. de Ávila, Carlos R. Borges Neto. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004.

27 p. – (*Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, 1676-1340; 66)

1. Tiririca roxa. 2. Fungo. 3. Crescimento micelial. 4. Esporulação. I. Ávila, Zilá R. de. II. Borges Neto, Carlos R. III. Título. IV. Série.

CDD 579.5

**Desenvolvimento de metodologia
para cultivo do fungo *Cercospora
caricis*, agente de biocontrole de
*Cyperus rotundus***

Sueli C. M. de Mello¹

Zilá R. de Ávila¹

Carlos R. Borges Neto¹

¹ Eng^o. Agr^o. , PhD Fitopatologia. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C. Postal 02372, CEP70770-900, Brasília, DF.

SUMÁRIO

Resumo	7
Abstract	8
Introdução	9
Material e Métodos	10
Resultados e Discussão	14
Conclusão	24
Referências Bibliográficas	24

D9esenvolvimento de metodologia para cultivo do fungo *Cercospora caricis*, agente de biocontrole de *Cyperus rotundus*

RESUMO

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ao longo dos seus 30 anos de existência, vem promovendo a formação de estoques de linhagens de microrganismos nativas, que podem ser utilizadas pela comunidade científica, em diversos programas de pesquisa. Isto tem possibilitado uma série de estudos com vistas ao controle biológico de pragas, a exemplo do presente trabalho. Isolados de *Cercospora caricis*, patogênicos a tiririca (*Cyperus rotundus*), foram avaliados quanto ao crescimento micelial e esporulação em condições variadas de cultivo. Em geral, nos testes envolvendo os isolados CEN 051 e CEN 055, o último foi superior em termos de crescimento micelial (diâmetro de colônia), porém apresentou valores médios de produção de esporos mais baixos. Destacaram-se os seguintes meios para cultivo do isolado CEN 055: extrato de folha de tiririca-ágar (EFTA), extrato de raiz de cenoura-ágar (ERCA), batata-dextrose-ágar (BDA), melão de cana-ágar (MCA), suco de folha de tiririca-ágar (SFTA) e o sintético CSM. O período de cultivo de sete dias mostrou ser adequado para a ocorrência de esporulação, em estudo envolvendo 10 isolados do fungo, apesar da baixa densidade de esporos verificada. Em outro estudo, 13 isolados foram testados quanto à capacidade de esporulação, em fragmentos de folha de tiririca dispostos sobre meio ágar-água. Registrou-se presença de esporos para todos os isolados, que, entretanto, reagiram diferentemente ao fotoperíodo.

Palavras-chave: tiririca roxa, fungo, crescimento micelial, esporulação.

ABSTRACT

Mello, S.C.M., Ávila, Z.R., Borges Neto, C.R. Development of a methodology for inoculum production of *Cercospora caricis*, a biological control agent of purple nutsedge.

Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, for the last 30 years, has promoted development of germoplasm banks of microorganisms. In this way, it has become possible to assess strains for use in several research programs, including biological control of agricultural pests, as is presented in this work. Isolates of *Cercospora caricis* that cause leafspot of purple nutsedge (*Cyperus rotundus*) were evaluated for mycelial growth and sporulation in different culture conditions. The isolate CEN 055 showed greater mycelial growth than did CEN 051. However, the isolate CEN 051 showed greater sporulation capacity. The best media for culturing isolate CEN 055 were: purple nutsedge leaf-extract agar, carrot root-extract agar, potato-dextrose agar, sugar cane molasses agar, nutsedge leaf-juice agar, and the synthetic CSM. A seven day culture period was suitable for observing the occurrence of sporulation in studies where 10 isolates were tested, despite the low spore density in these strains. In another study, 13 isolates were tested for sporulation capacity using nutsedge leaf fragments in water-agar media. Sporulation was observed for all isolates, despite differences in their responses to light.

Keywords: purple nutsedge, fungus, mycelial growth, sporulation.

INTRODUÇÃO

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ao longo dos seus 30 anos de existência, vem promovendo atividades destinadas à estruturação de bancos de germoplasma microbiano. Isto possibilitou a formação de estoques de linhagens nativas que podem ser utilizadas pela comunidade científica, em diversos programas de pesquisa. Entre os microrganismos que são mantidos na coleção de fungos, bactérias e actinomicetos para controle biológico de fitopatógenos e de plantas daninhas incluem-se, por exemplo, vários isolados de *Cercospora caricis* Oudem, todos caracterizados por critérios morfológicos, moleculares e de virulência.

O fungo *C. caricis* é um patógeno com elevada especificidade à espécie *Cyperus rotundus* L. (tiririca) e tem sido alvo de pesquisas para o biocontrole desta planta daninha (BORGES NETO, 1997; INGLIS et al., 2001; RIBEIRO et al., 1997; TEIXEIRA, 1999).

Apesar do grande número de espécies de *Cercospora* conhecidas, poucas têm sido cultivadas artificialmente ou estudadas do ponto de vista fisiológico. Existe um consenso de que essas espécies fúngicas apresentam, como características comuns, crescimento lento e escassez de esporulação, ou mesmo a sua ausência, em meios de cultivo utilizados rotineiramente em laboratório (BLANEY, 1987; CARISSE e KUSHALAPPA, 1989; PELOSO et al., 1989; FREEMAN e CHARUDATTAN, 1984; LOCH et al., 1975; SILVA et al., 1988; STAVELY e NIMMO, 1968).

Desse modo, a adequação de composições de meios de cultivo é fundamental para que se obtenha quantidades satisfatórias de inóculo de *C. caricis* para uso nos programas de pesquisa voltados ao biocontrole da tiririca. Além disso,

há indícios de que a capacidade de utilização de diferentes substratos possa influenciar na produção de

toxinas e metabólitos, resultando em variações na patogenicidade de isolados do fungo (TEIXEIRA, 1999).

Adicionalmente, a resposta de espécies de *Cercospora* ao efeito da luz é variável, algumas necessitando de período escuro para esporulação, outras, de luz contínua, ainda outras, de períodos de luz intercalados com escuro (BECKMAN e PAYNE, 1983; CALPOUZOS e STALLKNECHT, 1967; COOPERMAN e JENKINS, 1986; LOCH et al., 1975).

Considerando a importância dos fatos expostos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de composições de meios de cultura e regimes de luz no crescimento e esporulação de diversos isolados de *C. caricis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia do Núcleo Temático de Controle Biológico (NTCB) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, utilizando isolados de *C. caricis* pertencentes à coleção de fungos de interesse para controle biológico de plantas daninhas. A ativação das colônias, mantidas em meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) em tubos inclinados, sob refrigeração, se deu no mesmo meio, a 28^o C.

Em todos os ensaios conduzidos, os meios de cultura tiveram o pH ajustado para 5.5, considerado adequado para o cultivo de *C. caricis*, de acordo com Ribeiro et al. (1997). Os experimentos foram conduzidos pelo menos duas vezes em delineamento inteiramente casualizado e, a não ser nos casos especificados, os

resultados foram submetidos à análise de variância, seguida de comparação das médias, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Meios sólidos para o cultivo de *C. caricis*

Os ensaios para avaliação de meios de cultura foram realizados em duas etapas, utilizando os isolados CEN 051 e CEN 055 de *C. caricis*. Na primeira etapa, testaram-se os seguintes meios: V-8 caseiro-ágar (V8CA), preparado a partir do suco V-8 de confecção caseira; V-8 industrial-ágar (V8IA), a base de suco industrializado (marca Campbell); extrato de folha de cenoura-ágar (EFCA); extrato de folha de tiririca-ágar (EFTA); extrato de folha de milho-ágar (EFMA); extrato de raiz de cenoura-ágar (ERCA); meio de Richard (SRY); batata-dextrose-ágar (BDA) e o meio sintético CSM (TEIXEIRA, 1999). Na segunda etapa, utilizaram-se os meios: suco de folha de cenoura-ágar (SFCA); suco de folha de tiririca-ágar (SFTA); suco de folha de milho-ágar (SFMA); suco de raiz de beterraba-ágar (SRBA); leite de coco-ágar (LCA); melação de cana-ágar (MCA) e folha de tiririca seca-Ágar (AAFTS). Os procedimentos para o preparo dos meios de cultura foram descritos detalhadamente por Borges Neto (1997).

No centro de cada placa de Petri, contendo o meio de cultura, depositou-se um disco de micélio (7 mm de diâmetro) do fungo. A incubação ocorreu a 28 °C, sob fotoperíodo de 12 horas. O fotoperíodo foi simulado por meio de quatro lâmpadas fluorescentes de 20W, instaladas na porta da incubadora do tipo B.O.D. (Nova Técnica, modelo NT 708, AT). As avaliações do crescimento das colônias foram realizadas aos 34 dias de cultivo, observando-se também a ocorrência de esporulação.

Foram realizadas quatro repetições por tratamento, sendo a unidade experimental constituída de uma placa de Petri.

Avaliação da esporulação de isolados de *C. caricis* em diferentes períodos de cultivo

A fim de se determinar períodos de incubação adequados para avaliação de esporulação do fungo, realizou-se um ensaio, em que os isolados CEN 032, CEN 035, CEN 043, CEN 046, CEN 049, CEN 051, CEN 055, CEN 074, CEN 080 e CEN 081 foram cultivados em meio EFTA. Adotaram-se os períodos de cultivo de 7, 14, 21 e 28 dias. O estabelecimento das colônias foi realizado a partir de discos de micélio provenientes de culturas desenvolvidas em meio BDA. As condições para incubação foram as mesmas adotadas no experimento anterior. A verificação da presença de esporos foi registrada mediante exame sob microscópio óptico, de amostras de suspensões obtidas pela lavagem da superfície de cada colônia com 5,0 mL de água destilada. Das placas incubadas por 28 dias, foram também tomadas as medidas do diâmetro médio das colônias. Utilizaram-se três repetições por isolado, para cada período de incubação.

Determinação do efeito de regimes de luz e de meios de cultura sobre a esporulação de *C. caricis*

Para avaliar o efeito de diferentes regimes de luz sobre a esporulação dos isolados CEN 051 e CEN 055 de *C. caricis*, utilizaram-se, além dos meios V8CA, BDA, EFTA, um meio à base de suco de tomate caseiro (STCA), preparado como descrito por Borges Neto (1997). Empregaram-se 230 mL do suco concentrado, os quais foram diluídos em água destilada (quantidade suficiente para completar 1000mL do meio) e acrescidos de CaCO_3 (3g/L). Após a transferência dos discos de micélio como descrito anteriormente, as placas foram incubadas a 28^o C, sob quatro diferentes regimes de luz: 4 horas e 12 horas de alternância de luz (claro/escuro),

luz contínua (LC) e escuro contínuo (EC). Foram utilizadas cinco placas por tratamento

Aos sete dias de cultivo, determinou-se o número de esporos por placa, tomando-se as médias de três leituras em câmara de Neubauer, a partir de suspensões preparadas pela adição de 5,0mL de solução aquosa contendo Tween 20 (polioxietileno sorbitan monolaurate) a 0,02%.

Esporulação de *C. caricis* em fragmentos de folhas de tiririca

A esporulação de isolados de *C. caricis* em fragmentos de folhas de tiririca foi avaliada de acordo com a técnica desenvolvida por Vakalounakis (1982) para indução de esporulação de *Alternaria solani*. O experimento foi conduzido com três grupos de isolados: o primeiro, com os isolados CEN 051, CEN 055, CEN 074, CEN 034 e CEN 038; o segundo, com os isolados, CEN 081, CEN 043, CEN 049 e o terceiro, com os isolados CEN 080, CEN 046 e CEN 035. No segundo grupo, incluiu-se também um isolado de *C. beticola* (CEN 053), que vinha sendo usado como referência em trabalhos de caracterização morfológica e molecular. O isolado CEN 032 de *C. caricis* foi utilizado em todos os grupos.

Folhas sadias de tiririca foram coletadas de plantas cultivadas em casa de vegetação e cortadas em fragmentos de 1,5 cm. Estes fragmentos foram lavados em água de torneira, acondicionados em frascos Erlenmeyers contendo água destilada e autoclavados (120 °C/ 20 minutos). Após remoção do excesso de água com o auxílio de papel filtro, os fragmentos foram dispostos em placa de petri (10 fragmentos/ placa), contendo meio ágar-água. Sobre cada um dos fragmentos, depositou-se um disco de micélio retirado de colônias com 13 dias de idade, desenvolvidas em meio BDA. As placas foram incubadas durante sete dias a 28^o C, utilizando os mesmos fotoperíodos do item anterior.

Os fragmentos de folhas de tiririca colonizados pelo fungo foram coletados de cada placa individualmente e colocados em tubos de ensaio contendo 5 mL da solução de Tween a 0,02%. Após agitação por 30 segundos, a suspensão obtida foi filtrada em gaze, determinando-se a concentração de esporos, com auxílio de câmara de Neubauer. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Meios sólidos para o cultivo de *C. caricis*

Ao serem avaliadas diferentes composições de meios de cultura para o cultivo dos isolados de *C. caricis* (CEN 051 e CEN 055), observou-se interação entre meios de cultura e isolados (Figura 1). Os meios CSM e ERCA proporcionaram maiores valores médios de crescimento do isolado CEN 055, entretanto, não diferindo dos meios BDA e EFTA. Para o isolado CEN 051, os maiores valores foram obtidos com o meio BDA no primeiro experimento, contudo, esse resultado não foi consistente. Esporulação, embora escassa, foi observada com este isolado nos meios EFCA e EFTA.

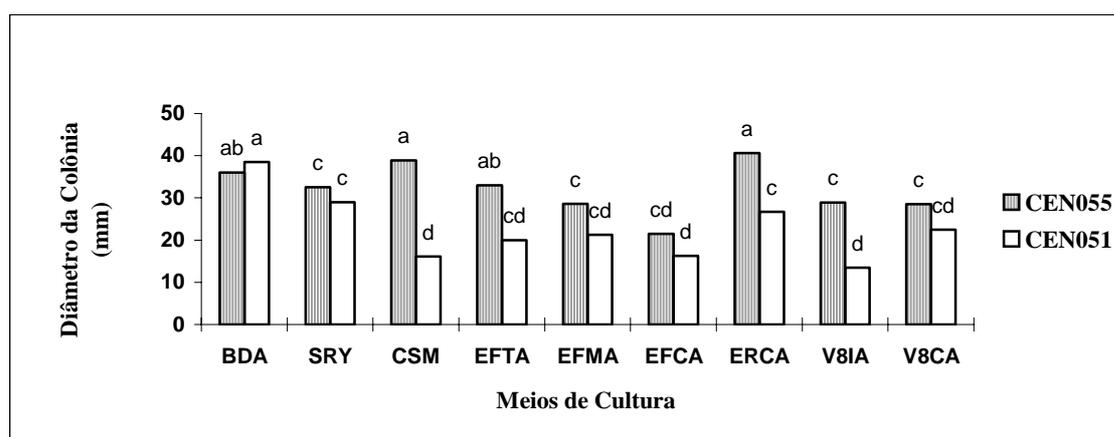


Figura 1- Diâmetro médio de colônias de *Cercospora caricis* aos 34 dias de cultivo. Suco V8 caseiro - ágar (V8CA); Suco V8 industrial - ágar (V8IA, marca Campbell); Extrato de folha de cenoura-ágar (EFCA); Extrato de folha de tiririca-ágar (EFTA); Extrato de folha de milho - ágar (EFMA); Extrato de raiz de cenoura-ágar (ERCA); Meio de Richard (SRY); CSM; Batata-dextrose-ágar (BDA). Barras referidas de mesma letra não diferiram estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Na segunda etapa deste experimento foi também observada diferença significativa entre meios de cultura e entre isolados (Figura 2). Os maiores diâmetros médios de colônias foram verificados com o isolado CEN 055, nos meios MCA e SFTA. O isolado CEN 051 apresentou diâmetro médio de colônia estatisticamente inferior, em todos os meios avaliados, evidenciando que independentemente do meio de cultivo, variações podem ocorrer entre isolados de *C. caricis* quanto ao crescimento micelial. As colônias do isolado CEN 051 não foram avaliadas nos meios SFCA e SFMA, o mesmo ocorrendo com o isolado CEN 055 no meio SRBA, devido à presença de contaminantes. As colônias crescidas em AAFTS apresentaram-se mais cotonosas, menos compactas e com coloração mais esbranquiçada do que nos demais meios. Nesta etapa não se observou a ocorrência de esporulação, com nenhum dos isolados e composições de meio avaliadas.

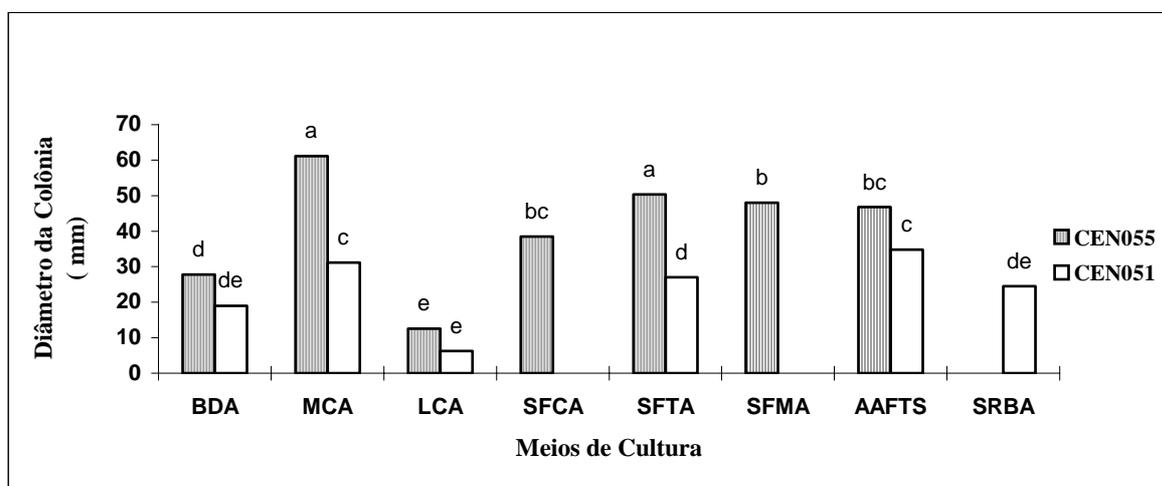


Figura 2- Diâmetro de colônias de *C. caricis* aos 34 dias de idade. Suco de folha de cenoura-ágar (SFCA); Suco de folha de tiririca-ágar (SFTA); Suco de folha de milho - ágar (SFMA); Suco de raiz de beterraba - ágar (SRBA); Leite de coco - ágar (LCA); Melaço de cana-ágar (MCA) e água - ágar + folha de tiririca seca (AAFTS). Barras referidas de mesma letra não diferiram estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Avaliação da esporulação de isolados de *C. caricis* em diferentes períodos de cultivo

Ao ser avaliada a esporulação de vários isolados de *C. caricis* em diferentes períodos de cultivo, observou-se esporulação de todos eles aos sete dias, sendo que a maioria das culturas permaneceu esporulante também aos 14 e 21 dias (Tabela 1). Entretanto, a esporulação em todos os períodos de avaliação mostrou-se bastante escassa, por isso não foi quantificada. Aos 28 dias, não se detectou presença de esporos em nenhuma das culturas. Também nos períodos de incubação inferiores a sete dias, não houve registro da presença de esporos. Por outro lado, o crescimento das colônias no meio agarizado foi extremamente lento, conforme indicam os valores médios do diâmetro das colônias tomados aos 28 dias (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios de diâmetro de colônias e esporulação de isolados de *Cercospora* em meio à base de extrato de folha de tiririca.

Isolados Diâmetro (mm)	Esporulação				
	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	
CEN 053	+	+	--	--	79,3a
CEN 081	+	--	--	--	61,7b
CEN 032	+	--	+	--	60,0b
CEN 115	+	+	+	--	53,7c
CEN 046	+	+	+	--	53,3c
CEN 144	+	+	+	--	47,7cd
CEN 143	+	+	+	--	45,0d
CEN 074	+	+	--	--	38,0e
CEN 055	+	+	--	--	36,3e
CEN 073	+	--	--	--	35,7e
CEN 142	+	+	+	--	27,3f

Médias seguidas por mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan. + : indica ocorrência de esporulação; --: indica ausência de esporulação

Embora os resultados deste experimento não tenham sido satisfatórios em termos de densidade de esporos, corroboram informações existentes na literatura de que sete dias de incubação possa ser adotado para espécies do gênero *Cercospora*. El-Gholl et al. (1982) verificaram que os melhores períodos para avaliação de

esporulação de *Cercospora* spp. foram aos quatro e aos sete dias. Silva et al. (1988) relataram acréscimo na esporulação de *Cercospora caribaea* e *C. henningsii* a partir do terceiro dia de cultivo, alcançando máxima esporulação no sexto e sétimo dias, com declínio após este período. Do mesmo modo, Peloso et al. (1989) obtiveram máxima esporulação de *C. coffeicola* aos sete dias de incubação, seguida de declínio. A redução da quantidade de esporos nas culturas com o decorrer do tempo pode ser explicada pela exaustão do meio exercendo efeito sobre o crescimento e fertilidade das hifas produzidas (CASTRO e COELHO, 2000; CARLILE e WATKINSON, 1996) e/ou pela germinação dos esporos, como foi relatado para *C. asparagi* por Cooperman e Jenkins (1986).

Determinação do efeito de regimes de luz e de meios de cultura sobre a esporulação de *C. caricis*

Os resultados dos experimentos conduzidos para determinação do efeito de regimes de luz sobre o desenvolvimento de *C. caricis* indicaram, de acordo com a análise de variância, interação tripla significativa ($p < 0,01$) entre isolados, meios de cultura e fotoperíodos, em relação à variável crescimento micelial. Diante disso, procedeu-se o desdobramento desta interação para cada isolado, revelando, para o isolado CEN 055, interação significativa entre meios de cultura e fotoperíodos (Tabela 2). Os melhores meios de cultura para crescimento micelial deste isolado foram: BDA, sob condições de escuro contínuo (EC) e 12 horas de luz, e meio EFTA, sob condições de escuro contínuo (EC), 4 e 12 horas de luz.

Para o isolado CEN 051, não houve interação entre meios de cultura e fotoperíodos. Os meios V8A e BDA, seguidos de EFTA, assim como fases de 12 e 4 horas de luz, foram as condições que proporcionaram maior crescimento micelial deste isolado (Tabela 3).

A análise de variância dos dados de produção de esporos revelou que a interação tripla não foi significativa. Entretanto, houve significância para as interações duplas isolados x meios ($p < 0,05$) e isolados x fotoperíodos ($p < 0,05$). De acordo com os resultados apresentados (Tabela 4), o meio EFTA proporcionou melhor produção de esporos para o isolado CEN 055. Para o isolado CEN051, maiores produções de esporos foram obtidas nos meios V8A, EFTA e STCA que não diferiram estatisticamente. Comparando a esporulação de ambos isolados nos meios de cultura, verificou-se que no meio EFTA, os mesmos não diferiram entre si, apresentando altos valores de esporulação. Já nos meios V8A e STCA, o isolado CEN051 superou o CEN055. O meio BDA proporcionou os mais baixos valores de esporulação para ambos isolados. Não houve efeito dos fotoperíodos para o isolado CEN 055, ou seja, a esporulação deste isolado independe do regime de luz. Entretanto, para o isolado CEN 051, maior produção de esporos ocorreu em condições de escuro contínuo seguido de fases de 4 e 12 horas de luz (Tabela 5).

Em geral, o isolado CEN 055 superou o CEN 051 em termos de crescimento micelial (diâmetro de colônia), porém apresentou valores médios de produção de esporos mais baixos (Tabela 6).

Tabela 2. Crescimento micelial do isolado CEN 055 em diferentes meios de cultura e regimes de luz.

Fotofases	Meios de cultura			
	V8A	STCA	BDA	EFTA
	Diâmetro micelial (mm)			
0h	42,8Ab	37,3Ab	56,1Aa	57,6Aa
4h	38,8Ab	30,0Ac	47,3Bab	52,8Aba
12h	20,1Bc	35,5Ab	57,8Aa	53,3Aba
24h	37,5Ab	29,1Ab	47,3ba	46,5Ba

Letras minúsculas comparam as médias no sentido horizontal. Letras maiúsculas comparam as médias no sentido vertical. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 3. Crescimento micelial do isolado CEN 051 em diferentes meios de cultura e regimes de luz.

Meios de cultura	Diâmetro micelial (mm)	Fotofases	Diâmetro micelial (mm)
V8A	41,6A	0h	37,2B
STCA	33,7B	4h	40,9AB
BDA	44,7A	12h	44,4A
EFTA	39,8AB	24h	37,4B

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 4. Esporulação dos isolados CEN 055 e CEN 051 em diversos meios de cultura.

Isolados	Meios de cultura			
	V8A	STCA	BDA	EFTA
CEN 055	0,90*bB	0,70bB	0,71bA	1,74aA
CEN 051	1,73aA	1,27abA	0,82bA	1,59aA

Letras minúsculas comparam as médias no sentido horizontal. Letras maiúsculas comparam as médias no sentido vertical. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%. * = $\times 10^4$ conídios/mL

Tabela 5. Esporulação dos isolados CEN 055 e CEN 051 em diversos regimes de luz.

Isolados	Fotofases			
	EC	4h	12h	CC
CEN 055	0,86*aB	1,39aA	0,93aB	0,88aA
CEN 051	1,73aA	1,33abA	1,42abA	0,94bA

Letras minúsculas comparam as médias no sentido horizontal. Letras maiúsculas comparam as médias no sentido vertical. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

* = $\times 10^4$ conídios /mL.

Tabela 6. Diâmetro médio das colônias e esporulação dos isolados CEN 055 e CEN 051.

Isolados	Diâmetro de colônia (mm)	$\times 10^4$ conídios/mL
CEN 055	43,1A	1,01B
CEN 051	40,0B	1,35A

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Os resultados de crescimento e esporulação de fungos fitopatogênicos encontrados na literatura são bastante variados, especialmente quando se trata do

gênero *Cercospora*. Ávila (2002) relatou maior produção micelial de *C. piaropi*, agente de biocontrole de *Eichhornia crassipes*, em meio à base de suco de tomate, porém maior esporulação ocorreu em meio à base de suco V-8. Carisse e Kushalappa (1989) observaram comportamento diferencial de *Cercospora carotae* em diversos meios avaliados, sendo que os meios CLA (extrato de folha de cenoura) e suco V-8 induziram maior esporulação do fungo. Para *C. asparagi* (COOPERMAN e JENKINS, 1986), esporulação ocorreu com todas as condições de luminosidade, embora tenha sido mais abundante nos regimes de escuro contínuo e 12 horas de luz alternada. Peloso et al. (1989) obtiveram maiores quantidades de esporos de *C. coffeicola* com regime de luz contínua, utilizando diversas composições de meios de cultura. Ávila (2002) observou a ocorrência de esporulação de *C. piaropi* somente na ausência de luz. Essa diversidade de resposta dos fitopatógenos em relação às composições de meios de cultura e fotoperíodos pode ser atribuída à variabilidade existente entre isolados, ou até, aos diferentes métodos experimentais utilizados.

Esporulação de *C. caricis* em fragmentos de folhas de tiririca.

Todos os isolados desenvolveram-se sobre os fragmentos de folha de tiririca, formando uma fina camada de micélio. A esporulação ocorreu em toda a superfície colonizada.

De acordo com a análise de variância, o teste F foi significativo ($p < 0,01$) no primeiro grupo de isolados, para a interação isolados x fotoperíodos, indicando existir dependência entre os dois fatores (Figura 3A). O desdobramento da interação mostrou que houve efeito do fotoperíodo ($p < 0,01$) sobre os isolados CEN 032, CEN 034 e CEN 038. Os isolados CEN 032 e CEN 034 apresentaram comportamento semelhante, não diferindo entre si e produzindo maior número de esporos em presença de luz. Destacaram-se os regimes de 4 horas de luz e claro contínuo, para

o CEN 032 e 4 horas, 12 horas de luz e claro contínuo, para o isolado CEN 034. Já o isolado CEN 038, cujos valores médios da produção de esporos foram inferiores aos dos dois isolados acima citados, apresentou maior densidade de esporos na ausência de luz. Para os outros dois isolados (CEN 051 e CEN 055), não houve efeito do fotoperíodo, ambos tendo apresentado capacidade de esporulação inferior aos demais isolados, nas condições em que foi realizado o experimento. Para o isolado CEN 055, esse resultado corrobora aquele obtido no item anterior, com a esporulação independente de regime de luz.

No segundo grupo, novamente o teste F foi significativo para a interação isolados x fotoperíodos ($p < 0,01$). O isolado CEN 032 superou os demais, apresentando maior produção de esporos em condições de 12 horas de luz e claro contínuo (Figura 3B). O isolado CEN 081 esporulou melhor sob fotoperíodo de 12 horas, enquanto os isolados CEN 043, CEN 049 e CEN 053 mostraram ser indiferentes aos fotoperíodos.

No terceiro grupo de isolados houve efeito significativo do fotoperíodo sobre os isolados CEN 032 ($p < 0,01$) e CEN 080 ($p < 0,05$). Para o isolado CEN 032, que novamente se mostrou superior aos demais quanto à capacidade de esporulação, os melhores regimes de luz foram, da mesma forma que no experimento anterior, 12 horas de luz e claro contínuo (Figura 3C). Também o isolado CEN 080 esporulou melhor em presença de luz. Para os isolados CEN 035 e CEN 046, não houve diferença significativa entre os valores médios de produção de esporos, nos diferentes regimes de luz.

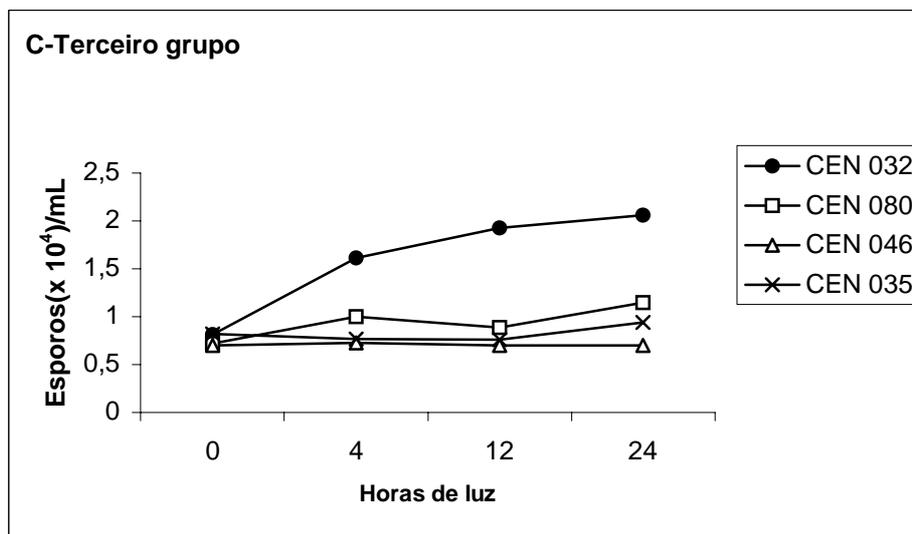
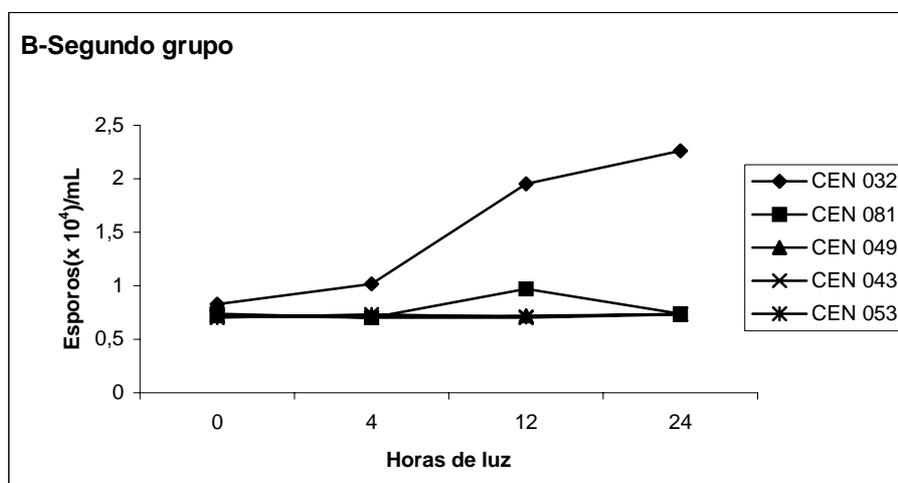
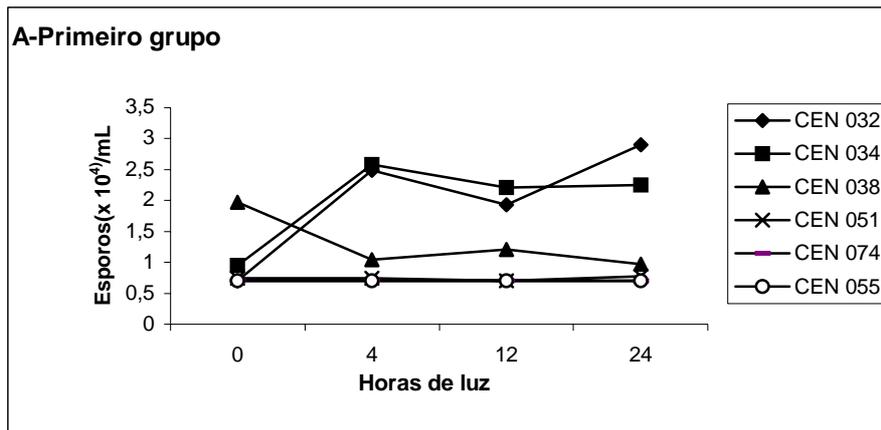


Figura 3A, B e C- Esporulação de diversos isolados de *Cercospora* em fragmentos de folhas de tiririca em diferentes fotoperíodos.

Este trabalho mostra que a utilização de fragmentos de folhas de tiririca para indução da esporulação de *C. caricis* constitui uma técnica simples, que possibilita a produção de esporos em condições completamente assépticas e em quantidades

suficientes para ensaios de laboratório e casa de vegetação. Portanto, trata-se de uma técnica que pode ser útil no caso de *Cercospora* spp. e outros fungos com característica fastidiosa.

O isolado CEN 032 foi utilizado como referência nos três ensaios por ter apresentado, de acordo com dados preliminares, considerável capacidade de esporulação. Essa capacidade foi confirmada neste trabalho. Desse modo, indica-se sua inclusão em futuros experimentos para avaliação de agentes candidatos, com vistas ao desenvolvimento de bioherbicidas. Sob condições favoráveis de campo, isolados que esporulam consistentemente podem ser hábeis para produzir abundância de inóculo secundário e terciário para subseqüentes ciclos de infecção, refletindo positivamente na eficácia do produto.

A necessidade de luz para o crescimento e esporulação de fungos é muito variável, até mesmo entre isolados da mesma espécie, conforme relatado por diferentes autores (LEACH, 1962; MASANGKAY et al., 2000; MELLO et al., 2000; MISAGHI et al., 1978; NACHTIGAL, 2000). Para espécies do gênero *Cercospora*, há relatos indicando o efeito positivo da exposição à luz, em regimes alternados com períodos de escuro, sobre a esporulação de isolados de *Cercospora arachidicola* (MORAES e SALGADO, 1978), *C. zea maydis* (BECKMAN e PAYNE, 1983) e *C. kikuchii* (DELA-CUEVA et al., 1997). Outros esporulam melhor na presença de luz contínua ou em escuro contínuo (CALPOUZOS e STALLKNECHT, 1967; COOPERMAN e JENKINS, 1986; LOCH et al., 1975). Os resultados obtidos neste trabalho indicam diversidade de reação de isolados da espécie de *C. caricis* a regimes de luz, tanto para crescimento micelial quanto para esporulação.

Os resultados aqui apresentados para o parâmetro esporulação revelaram que o isolado CEN 055 mostrou ser indiferente a regimes de luz, enquanto outros

isolados, especialmente no caso do CEN 032, a reação foi positiva com respeito à presença de luz. No entanto, em se tratando da espécie *C. caricis*, não existe garantia de comportamento padrão com relação às condições para produção de esporos, nem mesmo para um isolado especificamente. Estudos conduzidos por Blaney (1987) indicaram, inicialmente, a produção de esporos por um isolado de *C. caricis* obtido de *Cyperus esculentus* apenas quando incubado sob luz contínua. Entretanto, em experimento posterior com o mesmo isolado, utilizando os mesmos meios de cultura e temperaturas sob as quais o fungo foi incubado, observou-se esporulação nos regimes de 0, 12 e 24 h de luz, sugerindo que, além de meios de cultura e condições de incubação sob as quais os experimentos são conduzidos, há outros fatores que podem influenciar a esporulação de *C. caricis*, tais como metodologia usada para a obtenção da cultura estoque e idade da cultura.

CONCLUSÕES

Confirma-se a capacidade de esporulação do isolado CEN 032, para o qual a presença de luz é um fator positivo.

1. A utilização de fragmentos de folhas de tiririca para indução da esporulação de *C. caricis* constitui uma técnica viável, desde que se considere a interdependência entre isolado e regime de luz.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁVILA, Z. R. **Estudo de *Cercospora piaropi* como agente de controle biológico de *Eichhornia crassipes* e sua associação com o herbicida 2,4-D.** 2002. 92 f.

Tese (Doutorado em Agronomia)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

BECKMAN, P. M.; PAYNE, G. A. Cultural techniques and conditions influencing growth and sporulation of *Cercospora zeaе maydis* and lesion development in corn. **Phytopathology**, St. Paul, v. 73, n. 3, p. 286-289, 1983.

BLANEY, C. L. **Fungal pathogens with potential for biocontrol of yellow nutsedge (*Cyperus esculentus* L.)**. 1987. 41 f. Dissertação (Master of Science) - Department of Botany, North Carolina State University Raleigh.

BORGES NETO, C. R. **Estudos sobre *Cercospora caricis* como agente potencial de biocontrole da tiririca (*Cyperus rotundus* L.)**. 1997. 123 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Brasília, Brasília.

BOYETTE, C. D.; WEIDEMANN, G. J.; TE BEEST, D. O.; QUIMBY JUNIOR., P. C. Biological control of jimsonweed (*Datura stramonium*) with *Alternaria crassa*. **Weed Science**, Champaign, v. 39, n. 3, p. 678-681, 1991.

CALPOUZOS, L.; STALLKNECHT, G. F. Effects of light on sporulation of *Cercospora beticola*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 57, n. 7, p. 679-681, 1967.

CARISSE, O.; KUSHALAPPA, A. C. Effect of media, pH and temperature nos spore production and of inoculum concentration on number of lesions produced by *Cercospora carotae*. **Phytoprotection**, Saint-Hyacinthe, Canada, v. 70, p. 119-124, 1989.

CASTRO, N. R.; COÊLHO, R. S. B. Caracterização fisiológica de isolados de *Cercospora cruenta* em diferentes meios de cultura. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 26, p. 466-471, 2000.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. **The fungi**. San Diego: Academic Press, 1996. 482 p.

COOPERMAN, C. J.; JENKINS, S. F. Conditions influencing growth sporulation of *Cercospora asparagi* and *Cercospora* blight development in Asparagus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 76, n. 6, p. 617-622, 1986.

DELA-CUEVA, F. M.; NATURAL, M. P.; HAUTEA, R. A. Cultural requeriments for maximum conidial production of *Cercospora kikuchii*, the cause of purple seed stain of soybean. **Philippine Phytopathology**, Laguna, v. 31, p. 20-26, 1997.

EL-GHOLL, N. E.; ALFIERI JUNIOR, S. A.; RIDINGS, W. H.; Schoulties, C.L. Growth and sporulation in vitro of *Cercospora apii*, *Cercospora arachidicola*, *Cercospora kikuchii*, and other species of *Cercospora*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 60, n. 6, p. 862-868, 1982.

FREEMAN, T. E.; CHARUDATTAN, R. ***Cercospora rodmanii* conway a biocontrol agent for waterhyacinth**. Gainesville: University of Florida, 1984. 18 p. (Bulletin Technical, 842).

INGLIS, P. W.; TEIXEIRA, E. A.; RIBEIRO, D. M.; VALADARES-INGLIS, M. C.; TIGANO, M. S.; MELLO, S. C. M. Molecular markers for the characterization of brasilian *Cercospora caricis* isolates. **Current Microbiology**, New York, v. 42, p. 194-198. 2001.

LEACH, C. M. The quantitative and qualitative relationship of ultraviolet and visible radiation to the induction of reproduction in *Ascochyta pisi*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 40, n. 12, p. 1577-1602, 1962.

LOCH, L. C.; CARVALHO, M. G.; OLIVEIRA, L. M. Esporulação de *Cercospora capsici* em meio de cultura. **Experientiae**, Viçosa, v. 19, p. 259-286, 1975.

MASANGKAY, R. F. PAULITZ; T. C.; HALLET, S. G.; WATSON, A. K. Characterization of sporulation of *Alternaria alternata* f. sp. *sphenocleae*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 10, n. 4, p. 385-397, 2000.

MELLO, S. C. M.; ÁVILA, Z. R.; FONTES, E. M. G.; RIBEIRO, Z. M. A; PAIS, J. S. O. **Processo de produção do fungo *Alternaria cassiae* para biocontrole de fedegoso (*Senna obtusifolia*)**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 35 p. (Boletim de Pesquisa, 18).

MISAGHI, I. J.; GROGAN, R. G.; DUNIWAY, J. M; KIMBLE, K. A. Influence of Environment and culture media on spore morphology of *Alternaria alternata*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 68, n. 1, p. 29-34, 1978.

MORAES, S.; SALGADO, C. L. Influência da luz sobre a esporulação de *Cercospora arachidicola* Hori. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 4, p. 128-135, 1978.

NACHTIGAL, G. F. **Desenvolvimento de agente de controle biológico microbiano de *Egeria densa* e de *Egeria najas***. 2000. 160 f. Tese (Doutorado em Agronomia- Produção vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

PELOSO, M. C. del; FERNANDES, C. D.; FILGUEIRAS, A. T.; CHAVES, G. M. Esporulação de *Cercospora coffeicola* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, p. 44, 1989.

RIBEIRO, Z. M. de A.; MELLO, S. C. M.; FURLANETTO, C.; FIGUEIREDO, G.; FONTES, E. M. G. Characteristics of *Cercospora caricis*, a potencial biocontrol agent of *Cyperus rotundus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 4, p. 513-519, 1997.

SILVA, M. F.; CAVALCANTI, M. A.; POROCA, D. M.; LIMA, D. M. Cultivo e esporulação de *Cercospora caribaea* e *C. henningsii*, agentes causais de manchas foliares em mandioca. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 54-58, 1988.

STAVELY, J. R.; NIMMO, J. A. Relation of pH and nutrition to growth and sporulation of *Cercospora nicotianae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 58, n. 10, p. 1372-1376, 1968.

TE BEEST, D. O.; YANG, X. B.; CISAR, C. R. The status of biological control of weeds with fungal pathogens. **Annual Review Phytopathology**, Arkansas, v. 30, p. 637-657, 1992.

TEIXEIRA, E. A. **Infectividade, eficiência e variabilidade genética de *Cercospora caricis* em relação ao controle biológico de tiririca (*Cyperus rotundus* L.)**. 1999. 126 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade de Brasília, Brasília.

VAKALOUNAKIS, D. J. An efficient and simple technique for inducing profuse sporulation in *Alternaria solani*. **Phytopathology Mediterranea**, v. 21, p. 89-90, 1982.