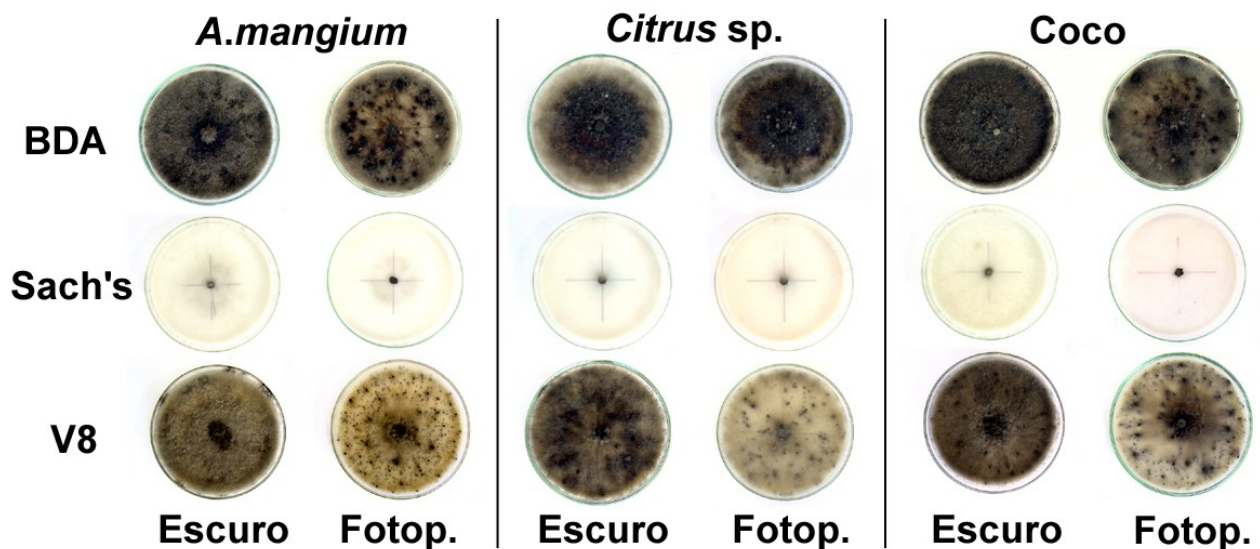


Influência de Meios de Cultura e Regimes de Luz na Esporulação e Crescimento Micelial de *Lasiodiplodia* *theobromae*



Fotos: Bernardo A. Halfeld Vieira

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva

Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Reinhold Stephanes

Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto

Presidente

Sílvio Crestana

Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Ernesto Paterniani

Hélio Tollini

Marcelo Barbosa Saintive

Membros

Diretoria–Executiva da Embrapa

Sílvio Crestana

Diretor-Presidente

José Geraldo Eugênio deFrança

Kepler Euclides Filho

Tatiana Deane de Abreu Sá

Diretores-Executivos

Embrapa Roraima

Antonio Carlos Centeno Cordeiro

Chefe Geral

Roberto Dantas de Medeiros

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Miguel Amador de Moura Neto

Chefe Adjunto de Administração



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agroflorestal de Roraima
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1981-609X
Junho, 2007

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 02

Influência de Meios de Cultura e Regimes de Luz na Esporulação e Crescimento Micelial de *Lasiodiplodia theobromae*

Bernardo de Almeida Halfeld-Vieira
Kátia de Lima Nechet
Giovanni Ribeiro de Souza

Boa Vista, RR
2007

Embrapa Roraima, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento,
Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Roraima

Rodovia BR-174, km 8 - Distrito Industrial

Cx. Postal 133 –CEP. 69.301-970

Boa Vista- Roraima-Brasil

Telefax: (95) 3626.7125

Home page: www.cpafr.embrapa.br

E-mail: sac@cpafr.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Roberto Dantas de Medeiros

Secretário-Executivo: Alberto Luiz Marsaro Júnior

Membros: Aloísio Alcântara Vilarinho

Gilvan Barbosa Ferreira

Kátia de Lima Nechet

Liane Marise Moreira Ferreira

Moisés Cordeiro Mourão de Oliveira Júnior

Normalização Bibliográfica: Maria José Borges Padilha

Editoração Eletrônica: Vera Lúcia Alvarenga Rosendo

1ª edição

1ª impressão (2007): 300

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Roraima

Halfeld-Vieira, Bernardo de Almeida

Influência de meios de cultura e regimes de luz na esporulação e crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* / por Bernardo de Almeida Halfeld-Vieira, Kátia de Lima Nechet e Giovanni Ribeiro de Souza. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2007.

14 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/ Embrapa Roraima; 2).

*0Acacia mangium. 2.Cocos nucifera.

I. Título. II. Série.

CDD: 634.973

SUMÁRIO

Resumo.....	04
Abstract.....	05
Introdução.....	06
Material e Métodos.....	06
Resultados e Discussão.....	07
Conclusões.....	10
Referências Bibliográficas.....	11

Influência de Meios de Cultura e Regimes de Luz na Esporulação e Crescimento Micelial de *Lasiodiplodia theobromae*

Bernardo de Almeida Halfeld-Vieira¹

Kátia de Lima Nechet²

Giovanni Ribeiro de Souza³

RESUMO

Foi estudada a influência dos meios BDA, V8 e Sach's e do fotoperíodo de 12 h e escuro contínuo no crescimento micelial e esporulação de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* obtidos de citros, coqueiro e acácia mangium. O experimento foi conduzido a 28 °C, em delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições e analisado em esquema fatorial 3x3x2. As avaliações foram feitas medindo-se periodicamente o diâmetro das colônias, contando-se o número de estromas 25 dias após o semeio e quantificando-se o número de esporos.ml⁻¹. Não houve interação entre fatores para crescimento micelial e ocorreu efeito significativo, somente do meio utilizado. Os meios BDA e V8 proporcionaram velocidade de crescimento micelial maior que o meio Sach's. Para formação de estromas, houve interação entre a origem do isolado, o meio em que se desenvolveu e o regime de fotoperíodo. O meio V8 proporcionou a formação de maior número de estromas e a exposição à iluminação estimulou sua formação, para todos os isolados, exceto quando utilizado o meio Sach's. O isolado obtido de coqueiro produziu maior número de estromas e o de citros o que produziu em menor número. Houve correlação positiva entre número de estromas e esporos produzidos. Pode-se concluir que o método mais eficiente para produção de esporos de *L. theobromae* em meio de cultura é utilizando como substrato o meio V8 em regime de fotoperíodo de 12 h.

Palavras-chave: *Lasiodiplodia theobromae*, metodologia, *Citrus* spp., *Cocos nucifera*, *Acacia mangium*

¹ Engenheiro Agrônomo, Doutor em Fitopatologia, Embrapa Roraima, CP 133, 69301-970, Boa Vista-RR, halfeld@cpafrr.embrapa.br.

² Engenheiro Agrônomo, Doutor em Fitopatologia, Embrapa Roraima, CP 133, 69301-970, Boa Vista-RR, katia@cpafrr.embrapa.br.,

³ Assistente A, Acadêmico de Agronomia da UFRR, Embrapa Roraima, CP 133, 69301-970, Boa Vista-RR, giovanni@cpafrr.embrapa.br

Influence of Culture Media and Photoperiod on Sporulation and Mycelial Growth of *Lasiodiplodia theobromae*

ABSTRACT

The purpose of this study was evaluate the influence of the culture media: BDA, V8 and Sach's associated to 12 h of photoperiod and continuous darkness in the mycelial growth and sporulation of *Lasiodiplodia theobromae* isolates from citrus, coconut and acacia mangium. The experimentation was conducted at 28 °C, arranged as factorial 3x3x2 in a completely randomized design with three replications. The evaluations were performed measuring periodically the colonies diameter, counting the number of stromata at 25 days after fungi cultivation and quantifying the spores number per ml. No interaction was detected between factors to mycelial growth, but a significative effect was detected to the culture media. The culture media BDA and V8 permitted higher growth rate than Sach's medium. To stromata production was detected interaction between isolate, culture media and the photoperiod. The culture medium V8 permitted higher development of stromata and the exposition to lightness stimulated its development to all isolates, except when Sach's medium was utilized as substrata. Between isolates, the culture from coconut presented higher capacity to producing stromata and from citrus produced in lower number. There was a positive correlationship between the stromata number and produced spores. The results permitted to conclude as the most efficient method to produce *L. theobromae* spores is utilizing the V8 culture media, when incubated at 12 h photoperiod.

Keywords: *Lasiodiplodia theobromae*, methods, *Citrus* spp., *Cocos nucifera*, *Acacia mangium*

Introdução

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. é normalmente considerado um patógeno fraco, entretanto, tem uma ampla gama de hospedeiros e vem sendo apontado como agente causal de danos consideráveis (Freire et al. 2003; Freire et al. 2004; Halfeld-Vieira & Nechet, 2005; Halfeld-Vieira et al. 2006; Pereira et al., 2006). Suas características em meio de cultura são muito variáveis e podem apresentar diferenças de acordo com o isolado, na coloração das colônias, velocidade de crescimento micelial e esporulação (Ram, 1993; Pereira et al., 2006). Dentre os meios mais utilizados para crescimento fúngico e esporulação estão o meio Batata Dextrose Agar (BDA) e V8. Já o meio Sach's, pode ser utilizado para induzir a formação de estromas (Dhingra & Sinclair, 1994, Nechet & Halfeld-Vieira, 2005) em fungos que produzem esta estrutura, como *L. theobromae*. Apesar de haver informações sobre influência de diversos fatores, como meio de cultura, origem do isolado e fotoperíodo, as interações entre eles não têm sido objeto de investigação, estudando-se somente cada fator isoladamente. O objetivo deste trabalho foi estudar a influência dos meios BDA, V8 e Sach's e dos fotoperíodos de 12 h e escuro contínuo, no crescimento micelial e esporulação de isolados de *L. theobromae* obtidos de citros, coqueiro e acácia mangium.

Material e métodos

Foram obtidas culturas puras de *L. theobromae*, provenientes de plantas de citros (*Citrus* sp.), coco (*Cocos nucifera* L.) e *Acacia mangium* Willd., oriundas de Roraima. Discos de micélio dos três isolados de *L. theobromae* foram depositados separadamente em placas de Petri, contendo os meios de cultura BDA, V8 e Sach's (Dhingra & Sinclair, 1994), constituindo seis réplicas por isolado, em cada meio de cultura. Para três réplicas, o material foi levado para incubadora e mantido em fotoperíodo de 12 h e, as três restantes, mantidas em escuro contínuo, ambas em incubadora a 28 °C. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições, sendo cada repetição uma placa de Petri. Os parâmetros avaliados foram: medição diária do diâmetro das colônias, até que atingissem o diâmetro máximo; as características das culturas e o número de estromas e esporos aos 25 dias após o semeio. Os resultados foram analisados em esquema fatorial 3x3x2. Para determinação do meio que proporcionou melhores condições para esporulação, aos 25 dias após a repicagem, cada meio de

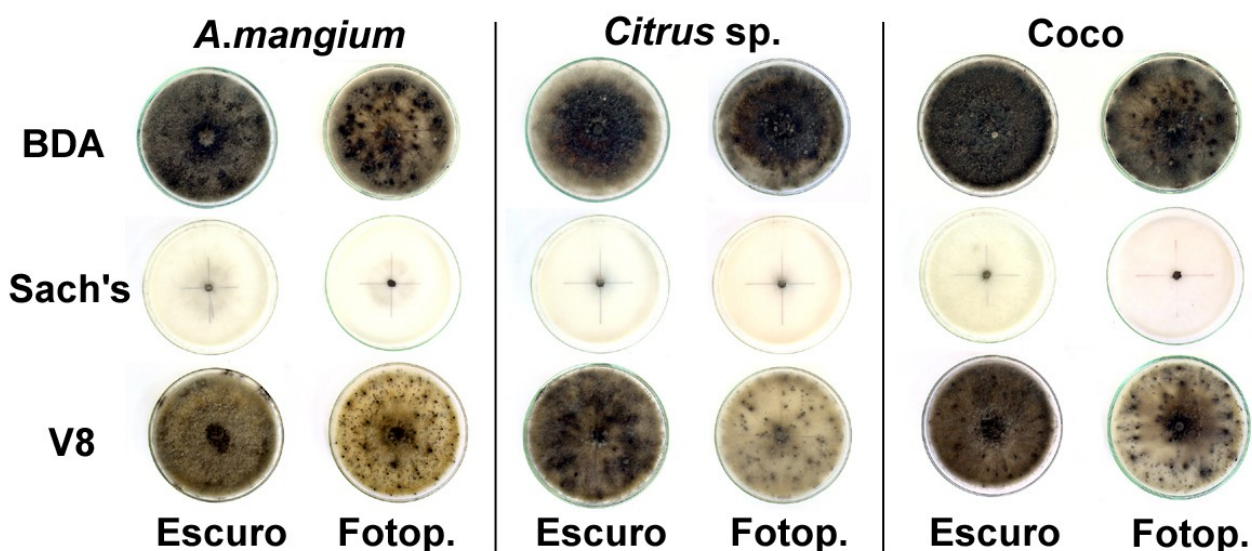
9 Influência de Meios de Cultura e Regimes de Luz na Esporulação e Crescimento Micelial de *Lasiodiplodia theobromae*

cultura contendo o crescimento fúngico foi triturado em liquidificador, adicionando-se 10 ml de água destilada e coando-se o material resultante com gaze. O número de

esporos.ml⁻¹ foi quantificado em câmara de Neubauer. As análises foram realizadas com o uso do software SAS 8.0. A correlação entre o número de estromas e esporos foi realizada por meio da correlação de Spearman, com o uso do software Statistica 6.0.

Resultados e discussão

As características fenotípicas dos isolados variaram de acordo com meio utilizado e o regime de luz a que foram submetidos (Figura 1). Observou-se que nos meios BDA e V8, o crescimento micelial foi abundante, enquanto no meio Sach's houve menor densidade de hifas, que assumiram coloração mais clara. A maior densidade de hifas também foi observada em condições de regime de escuro contínuo, proporcionando aspecto de maior escurecimento das colônias.



Fotos: Bernardo A. Halfeld Vieira

Fig. 1. Características culturais de isolados de *L. theobromae*, provenientes de *Acacia mangium*, *Citrus* e coco, nos meios de cultura BDA, Sach's e V8, em condições de escuro contínuo e fotoperíodo de 12 h.

Ram (1993) e Pereira (2006) também encontraram variações na coloração das colônias e no crescimento micelial entre isolados de *L. theobromae* obtidos de diversas culturas. Ram (1993) reporta que houve predominância de colônias com coloração marrom, enquanto Pereira (2006), afirma ter predominado a coloração branco-acinzentado. No presente estudo, verificou-se que a coloração cinza-escuro foi predominante para os isolados cultivados em meio BDA e V8, enquanto que, em meio Sach's a coloração apresenta-se mais clara, principalmente pela menor abundância de micélio (Figura 1). É importante destacar que Ram avaliou a coloração das colônias, 48 h após a deposição

dos discos de micélio em cultura, e Pereira (2006) 15 dias após, o que pode ter gerado tais diferenças na caracterização das colorações.

Na avaliação do crescimento micelial não houve interação entre fatores, ocorrendo efeito significativo somente do meio utilizado. Os meios BDA e V8 proporcionaram uma velocidade de crescimento micelial maior do que o meio Sach's (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito de diferentes meios de cultura no crescimento micelial (cm.dia⁻¹) de *L. theobromae*.

Meio	Média	
V8	3,74	A
BDA	3,62	A
Sach's	1,96	B

*Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Fisher-LSD ($p < 0,05$).

As taxas de crescimento micelial obtidas neste estudo foram semelhantes às encontradas por Pereira et al. (1993), entretanto, os meios V8 e BDA não proporcionaram diferença significativa neste fator, diferentemente dos resultados destes autores.

Para formação de estromas aos 25 dias após o semeio, houve interação entre a origem do isolado utilizado, o meio de cultura e o regime de fotoperíodo utilizado. Pelos resultados apresentados observa-se que o meio V8 proporcionou a formação de maior número de estromas (Tabelas 2 e 3) e que a exposição à iluminação estimula significativamente a sua formação para todos os isolados, exceto quando é utilizado o meio Sach's como substrato (Tabelas 3 e 4).

Tabela 2. Interação entre meios de cultura e isolados de *L. theobromae* na formação de estromas, aos 25 dias após a repicagem.

Meio	<i>A. mangium</i>		<i>Citrus sp.</i>			Coco			
V8	337,67*	A	a	76,00	A	b	295,50	A	a
BDA	42,33	B	b	37,67	AB	b	111,00	AB	a
Sach's	0,00	B	a	2,33	B	a	0,00	B	a

*Número de estromas. Médias indicadas por letras maiúsculas, representam não haver diferença significativa no sentido da coluna e médias indicadas por letras minúsculas, representam não haver diferença significativa no sentido da linha, segundo teste Fisher-LSD ($p < 0,05$).

Constatou-se também que, dependendo da origem do isolado, há formação de maior ou menor número de estromas. O isolado obtido de coqueiro foi o que teve maior capacidade em formar estromas e o de *Citrus* sp. o que produziu menor número (Tabelas 2 e 4).

Tabela 3. Interação entre regimes de fotoperíodo e meios de cultura utilizados, na formação de estromas de *L. theobromae*, 25 dias após a repicagem.

Meio	Escuro				Fotoperíodo		
	V8	33,67*	A	b	439,11	A	a
BDA	8,89	B	b	118,44	B	a	
Sach's	0,00	B	a	1,56	B	a	

*Número de estromas. Médias indicadas por letras maiúsculas, representam não haver diferença significativa no sentido da coluna e médias indicadas por letras minúsculas, representam não haver diferença significativa no sentido da linha, segundo teste Fisher-LSD ($p < 0,05$).

Tabela 4. Interação entre regimes de fotoperíodo e origem dos isolados, na formação de estromas de *L. theobromae* 25 dias após a repicagem.

Luz	<i>A. mangium</i>		<i>Citrus</i> sp.			Coco			
Fotoperíodo	239,22	A	a	68,11	A	b	251,78	A	a
Escuro	14,11	B	ab	9,22	B	b	19,22	B	a

*Número de estromas. Médias indicadas por letras maiúsculas, representam não haver diferença significativa no sentido da coluna e médias indicadas por letras minúsculas, representam não haver diferença significativa no sentido da linha, segundo teste Fisher-LSD ($p < 0,05$).

Houve correlação significativa entre número de estromas e esporos produzidos. Portanto, como esperado, as condições que favorecem a formação de estromas influem diretamente na quantidade de esporos (Tabela 5).

Tabela 5. Significância (p) da correlação de Spearman entre o número de estromas e de esporos jovens e maduros de *L. theobromae*.

Parâmetro	p
Esporos jovens	0,000009
Esporos maduros	0,000002

Verificando o número de estromas formados, percebe-se que este fator é altamente variável, quando comparado com valores encontrados por outros autores. Pereira et al. (2006), por exemplo, reporta a produção de um valor médio máximo de 9,8 picnídios aos 15 dias após o semeio em BDA e 4,9 picnídios em V8. Estes valores contrastam com o presente estudo, em que se conseguiu obter um número muito superior de estromas. Analisando a Figura 2, observa-se que estas diferenças não são explicadas devido a Pereira et al. (2006) terem avaliado a produção de picnídios aos 15 dias após o semeio, e não aos 25 dias após o semeio, como no presente estudo.

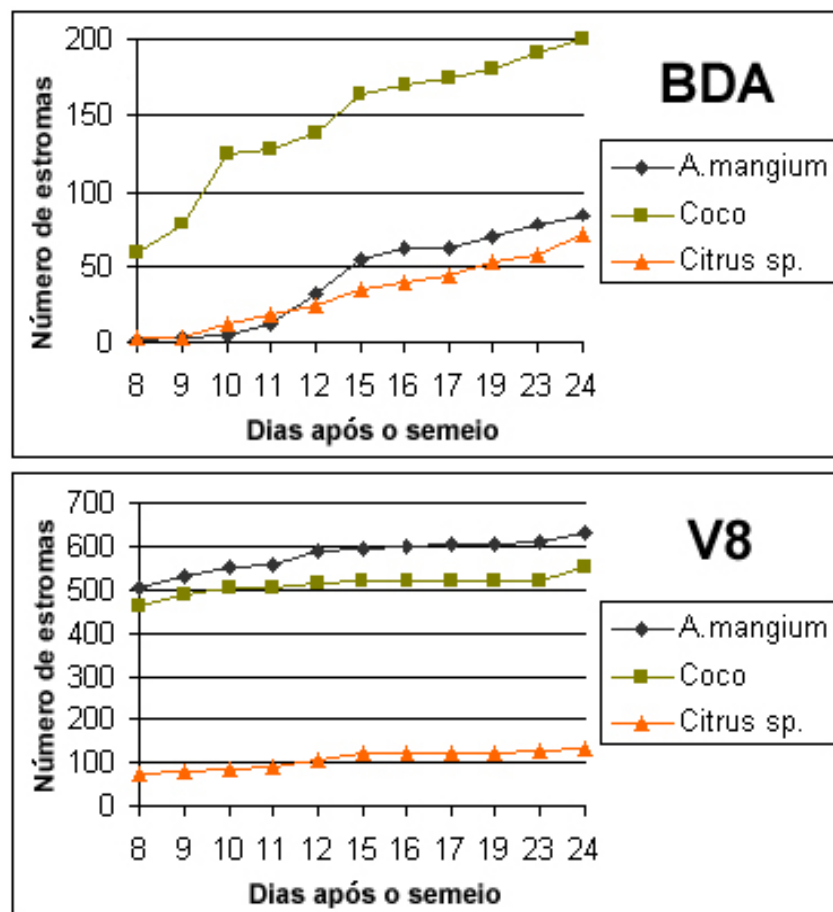


Figura 2. Produção média de estromas de *L. theobromae* na condição de fotoperíodo de 12 h para isolados de *Acacia mangium*, *Citrus* e coco, nos meios de cultura BDA e V8.

Conclusões

O fotoperíodo tem influência na esporulação quando são utilizados substratos que propiciam um bom crescimento micelial de culturas de *L. theobromae*;

A capacidade em produzir esporos *in vitro* é variável de acordo com a origem do isolado;

Um método eficiente para produção de esporos de *L. theobromae* em meio de cultura é utilizando como substrato o meio V8 em regime de fotoperíodo de 12 h.

Referências bibliográficas

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic Plant Pathology Methods**. 2 ed. Boca Raton: CRC. 1994. 434 p.

FREIRE, F.C.O; CARDOSO, J.E.; VIANA, F.M.P. (Eds.) **Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2003. 687 p.

FREIRE, F.C.O.; VIANA, F.M.P.; CARDOSO, J.E.; SANTOS, A.A. **Novos hospedeiros do fungo *Lasiodiplodia theobromae* no estado do Ceará**. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 91). Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. 6 p.

HALFELD-VIEIRA, B.A.; NECHET, K.L. Queda de frutos em coqueiro causada por *Lasiodiplodia theobromae* em Roraima. **Fitopatologia Brasileira**. v. 30, n. 2, p. 203, 2005.

HALFELD-VIEIRA, B.A.; MOURÃO JUNIOR, M.; TONINI, H.; NECHET, K.L. Podridão do lenho em plantios homogêneos de *Acacia mangium*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 41, n. 4 .p. 709-711, 2006.

NECHET, K.L.; HALFELD-VIEIRA, B.A. *Curvularia lunata* var. *aeria* causando queima foliar em *Zoysia japonica*. **Fitopatologia Brasileira**. v. 30, n. 4, p. 438, 2005.

PEREIRA, A.L.; SILVA, G.S.; RIBEIRO, V.Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**. v. 31, n. 6, p. 572-578, 2006.

RAM, C. Características culturais, esporulação e virulência do “strain” do *Botryodiplodia theobromae*, agente causal da queima-das-folhas do coqueiro (*Cocos nucifera*). **Fitopatologia Brasileira**. v.18, p.143-146, 1993.

Embrapa

Roraima

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

