

INFLUÊNCIA DE MEIOS DE CULTURA, pH E DO
REGIME LUMINOSO NO CRESCIMENTO E
ESPORULAÇÃO DE **Colletotrichum**
corchorum IKATA & TANA



MINISTRO DA AGRICULTURA

Ângelo Amaury Stabile

Presidente da EMBRAPA

Eliseu Roberto de Andrade Alves

Diretoria Executiva da EMBRAPA

Ágide Gorgatti Netto	— Diretor
José Prazeres Ramalho de Castro	— Diretor
Raymundo Fonsêca Souza	— Diretor

Chefia do CPATU

Cristo Nazaré Barbosa do Nascimento	— Chefe
José Furlan Junior	— Chefe Adjunto Técnico
José de Brito Lourenço Junior	— Chefe Adjunto Administrativo

**INFLUÊNCIA DE MEIOS DE CULTURA, pH E DO REGIME LUMINOSO
NO CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DE *Colletotrichum corchorum*
IKATA & TANA**

Maria de Lourdes Reis Duarte

Eng.º Agr.º, M.S. em Fitopatologia,
Pesquisadora do CPATU

Angela Maria Leite Nunes

Eng.º Agr.º, Bolsista do CNPq

Fernando Carneiro de Albuquerque

Eng.º Agr.º, M.S. em Fitopatologia,
Pesquisador do CPATU



EMBRAPA

CENTRO DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DO TRÓPICO ÚMIDO

Belém, Pará

ISSN 0100-8102

EDITOR: Comitê de Publicações do CPATU
Trav. Dr. Enéas Pinheiro, s/n.º
Caixa Postal, 48
66000 — Belém, PA
Telex (091)1210

Duarte, Maria de Lourdes Reis

Influência de meios de cultura, pH e do regime luminoso no crescimento e esporulação de **Colletotrichum corchorum** Ikata & Tana, por Maria de Lourdes Reis Duarte, Angela Maria Leite Nunes e Fernando Carneiro de Albuquerque. Belém, EMBRAPA-CPATU, 1982.

19p. ilustr. (EMBRAPA-CPATU. Boletim de Pesquisa, 48).

1. Fungo — Meio de cultura. 2. Fungo — Reprodução. I. Nunes, Angela Maria Leite. II. Albuquerque, Fernando Carneiro de. III. Título. IV. Série.

CDD: 589.20416

© EMBRAPA , 1982

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	5
MATERIAL E MÉTODOS	6
Influência de diferentes meios de cultura.....	6
Efeito de diferentes níveis de pH do meio de cultura.	7
Influência de diferentes regimes de luz.....	8
RESULTADOS	8
Influência de diferentes meios de cultura.....	8
Efeito de diferentes níveis de pH do meio de cultura.....	11
Influência de diferentes regimes de luz.....	11
DISCUSSÃO	16
REFERÊNCIAS	18

INFLUÊNCIA DE MEIOS DE CULTURA, pH E DO REGIME LUMINOSO NO CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DE *Colletotrichum corchorum* IKATA & TANA

RESUMO : Ensaios foram conduzidos em condições de laboratório visando selecionar meios de cultura e estudar a influência do pH do meio de cultura e do regime luminoso no crescimento e esporulação de *Colletotrichum corchorum* Ikata & Tana. Entre os meios de cultura testados, os que mais favoreceram o crescimento radial foram raiz de cenoura-ágar e batata-sucrose-ágar (BSA), mas, a esporulação foi mais abundante em BSA. O patógeno cresceu e esporulou bem quando as colônias do fungo foram cultivadas em BSA com índice de pH 5,5 e 6,0. As colônias submetidas a um regime contínuo de luz cresceram e esporularam bem, quando comparadas com os regimes contínuo de escuro e alternado de doze horas de luz e doze horas de escuro.

INTRODUÇÃO

A cultura da juta (*Corchorus capsularis* L.), na Amazônia, tem grande importância econômica e social, haja vista ser uma cultura de baixa renda que envolve mão-de-obra familiar (Libonati 1958).

Originária da Ásia e introduzida na Amazônia por volta de 1920, encontrou condições adequadas ao seu desenvolvimento na região do Trópico Úmido Brasileiro, onde é explorada para produção de fibras e de sementes destinadas a novos plantios.

Nos cultivos de terra firme, destinados à produção de sementes, a juta é afetada por várias doenças, entre as quais, a antracnose causada por *Colletotrichum corchorum* Ikata & Tana. O primeiro relato da doença foi feito na Índia, em 1940 (Ikata & Yoshida 1940, Ghosh 1957). Na Amazônia, a primeira referência à doença foi feita em 1948 (Dantas 1948), em plantios de terra firme, em áreas experimentais do extinto Instituto Agrônomo do Norte, em Belterra. Município de Santarém, Estado do Pará. Estudando a etiologia da doença,

o autor identificou o agente patogênico como pertencente ao gênero **Vermicularia** sp., contudo, não confirmou definitivamente esta identificação. A constatação oficial de **C. corchorum** na Amazônia, só foi feita em 1978 (Freire & Albuquerque 1978), quando os autores descreveram os sintomas e as características morfológicas do patógeno. Acredita-se que este patógeno tenha sido introduzido em 1920 nas sementes provenientes da Ásia, já que este pode transmitir-se pelas sementes.

Os dados da literatura fazem referência a trabalhos relacionados com raças fisiológicas (Choudhury & Ahmed 1969), fitoalexinas (Purkayastha & Ray 1975), efeito de hormônios e elementos minerais sobre o desenvolvimento de lesões (Purkayastha & Ray 1977). O efeito de alguns dos principais fatores ambientais e nutricionais sobre a germinação dos esporos de **C. corchorum** foi estudado por Ray & Purkayastha (1977). Nenhum trabalho foi desenvolvido visando estudar o efeito de fatores ambientais no desenvolvimento e esporulação do fungo.

Considerando-se a necessidade de produzir inóculo para prover os testes de verificação da reação de cultivares de juta frente ao patógeno, foram conduzidos ensaios, no laboratório de Fitopatologia do CPATU, cujos objetivos foram selecionar meios de cultura mais adequados, estudar a influência do pH do meio de cultura e o efeito do regime luminoso no crescimento e esporulação de **C. corchorum**. No presente trabalho, são apresentados e discutidos os resultados obtidos nestes ensaios.

MATERIAL E MÉTODOS

Em todos os ensaios foram usadas culturas monospóricas de **C. corchorum**, obtidas de colônias desenvolvidas por cinco dias, em ambiente de laboratório.

Influência de diferentes meios de cultura

Após a obtenção das culturas monospóricas do fungo, foram feitas repicagens para placas de Petri, contendo 20 ml do meio de cultura BDA (batata, 200 g; dextrose, 20 g; ágar, 20 g). Estas placas foram mantidas à temperatura de 28°C e em regime contínuo de luz

por oito dias. Após este período, discos de 3 mm de diâmetro foram retirados da zona de crescimento ativo das colônias e transferidos para o centro de placas de Petri, contendo os seguintes meios de cultura: BDA, cenoura-ágar (raízes de cenoura, 250 g; ágar, 20 g), BSA (batata, 200 g; sucrose, 20 g; ágar, 20 g), Czapek-Dox (NaNO_3 , 2 g; KH_2PO_4 , 1 g; $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; ClK , 0,5 g; sucrose, 15 g; ágar, 20 g), Aveia-ágar (farinha de aveia, 80 g; ágar, 12 g), Decocção de folhas de juta-ágar (Folhas jovens de juta, 100 g; ágar, 20 g) e ágar-água (ágar, 20 g; água, 1000 ml). Após a repicagem, as placas foram mantidas à temperatura constante de 28°C, e em regime contínuo de luz, em câmara de crescimento do tipo FORMA SCIENTIFIC. O delineamento experimental usado foi inteiramente casualizado com sete tratamentos e seis repetições, perfazendo um total de 42 parcelas. Cada parcela foi representada por uma placa de Petri. A avaliação do crescimento radial foi feita através da determinação do diâmetro das colônias expresso em milímetros, usando-se um compasso tira-linhas, enquanto que a esporulação foi medida, usando-se a câmara de contagem de Neubauer. Para cálculo da concentração de esporos por mililitro, usou-se a fórmula proposta por Tuite (1969), para esporos pequenos. A análise da variância foi feita de acordo com o delineamento experimental proposto e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Efeito de diferentes níveis de pH do meio de cultura

Culturas monospóricas de **C. corchorum** foram cultivadas em placa de Petri contendo 20 ml de meio de cultura BDA durante oito dias, à temperatura de 28°C, em regime contínuo de luz. Após este período, discos de colônias de 3 m de diâmetro, retirados das zonas de crescimento ativo das colônias foram repicados para o centro de placa de Petri, contendo 20 ml do meio de cultura BSA, com diferentes níveis de pH. Foram testados os seguintes níveis de pH: 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0. Estes níveis foram ajustados com solução de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico a 1%. Após a repicagem, as placas de Petri foram mantidas à temperatura constante de 28°C e em regime contínuo de luz, até o momento da avaliação.

O delineamento experimental usado foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e sete repetições, perfazendo um total de 42 parcelas. Cada parcela foi representada por uma placa de Petri.

O crescimento radial e a esporulação foram medidas como no experimento anterior. Foi feita de análise da variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

Influência de diferentes regimes de luz

Discos de 3 mm, retirados da zona de crescimento de colônias de **C. corchorum** desenvolvidas por oito dias em placas de Petri, contendo o meio de cultura BDA, foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo o meio de cultura BSA. Após a repicagem, as placas foram mantidas em regime contínuo de luz, regime contínuo de escuro e regime alternado de doze horas de luz e doze horas de escuro, e à temperatura de 28°C, por oito dias. Estes regimes luminosos constituíram os tratamentos.

O delineamento experimental usado foi inteiramente casualizado com três tratamentos e dez repetições, perfazendo um total de 30 parcelas. Cada placa de Petri constituiu uma repetição. A avaliação do crescimento radial e esporulação foi feita como nos experimentos anteriores. Foi feita a análise da variância e as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Influência de diferentes meios de cultura

Entre os meios de cultura testados os que mais favoreceram o crescimento radial, em ordem decrescente, foram cenoura-ágar, BSA, BDA e decocção de folhas de juta-ágar. Os meios de cultura ágar-águas, aveia-ágar e Czapek-Dox, situaram-se entre os que menos favoreceram o crescimento radial (Fig. 1). Houve diferença altamente significativa entre os meios testados, ao nível de 1% de probabilidade, quando compararam-se as médias do crescimento radial das colônias, pelo teste de Tukey. Cenoura-ágar foi o meio de cultura que mais favoreceu o crescimento radial, entretanto este meio de cultura não diferiu significativamente do BSA, mas, ambos diferiram dos demais. Czapek-Dox foi o meio de cultura que menos favoreceu o

crescimento radial, pois, enquanto que no meio de cultura cenoura-ágar, o diâmetro das colônias atingiu 64,8 mm, em Czapek-Dox, as colônias cresceram apenas 19,5 mm, em igual período (Fig. 1).

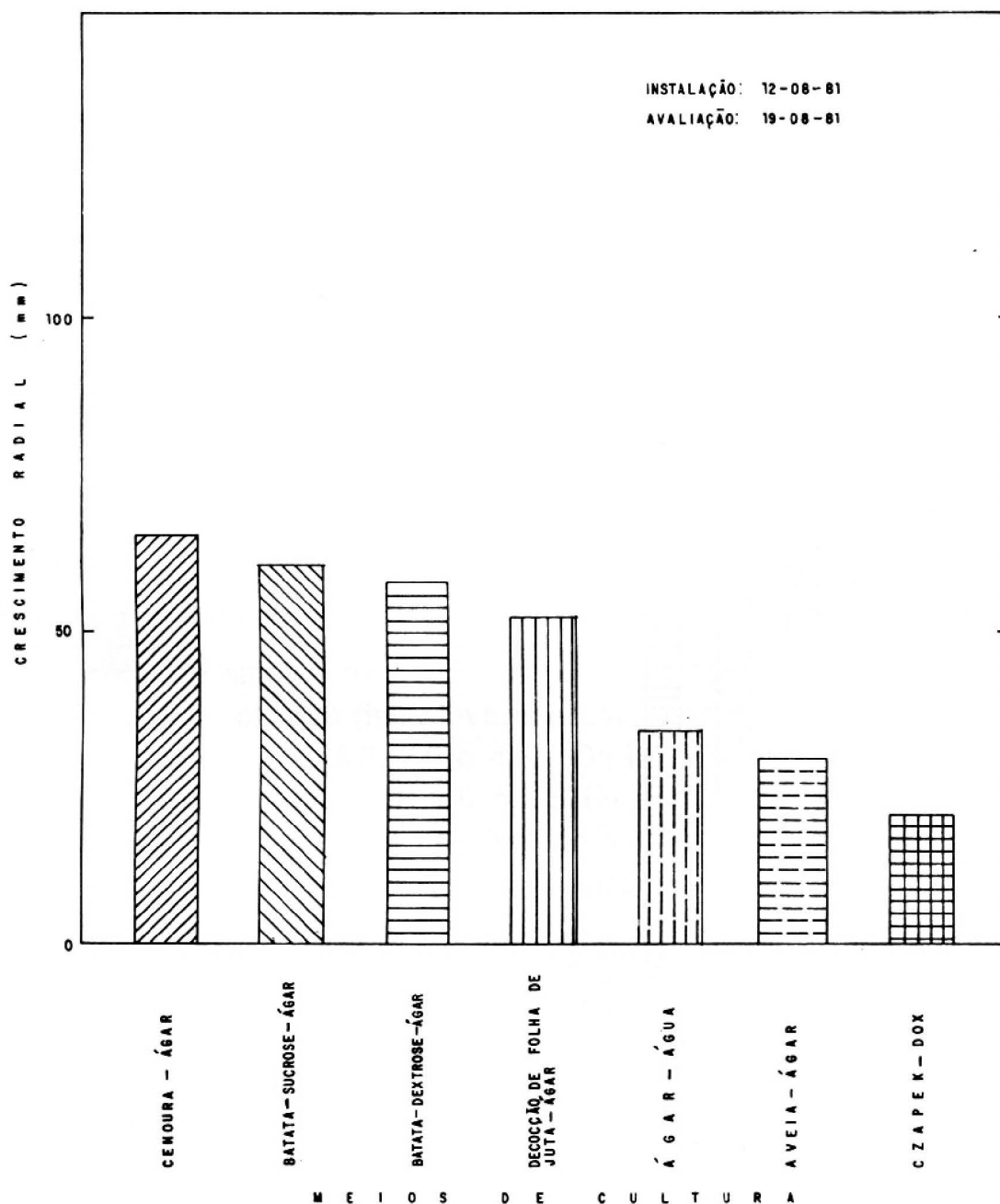


FIG. 1 — Efeito de diferentes meios de cultura no crescimento radial de colônias de *C. corchorum* (Média de seis repetições).

Quando se analisou a produção de esporos, observou-se que o maior índice de esporulação foi obtido, quando colônias do patógeno foram cultivadas em meio de cultura BSA (Fig. 2). Seguem em

ordem decrescente, BDA, aveia-ágar e cenoura-ágar. Os menores índices de esporulação foram observados quando o fungo foi cultivado nos meios de cultura decocção de folhas de juta-ágar, Czapek-Dox e ágar-água.

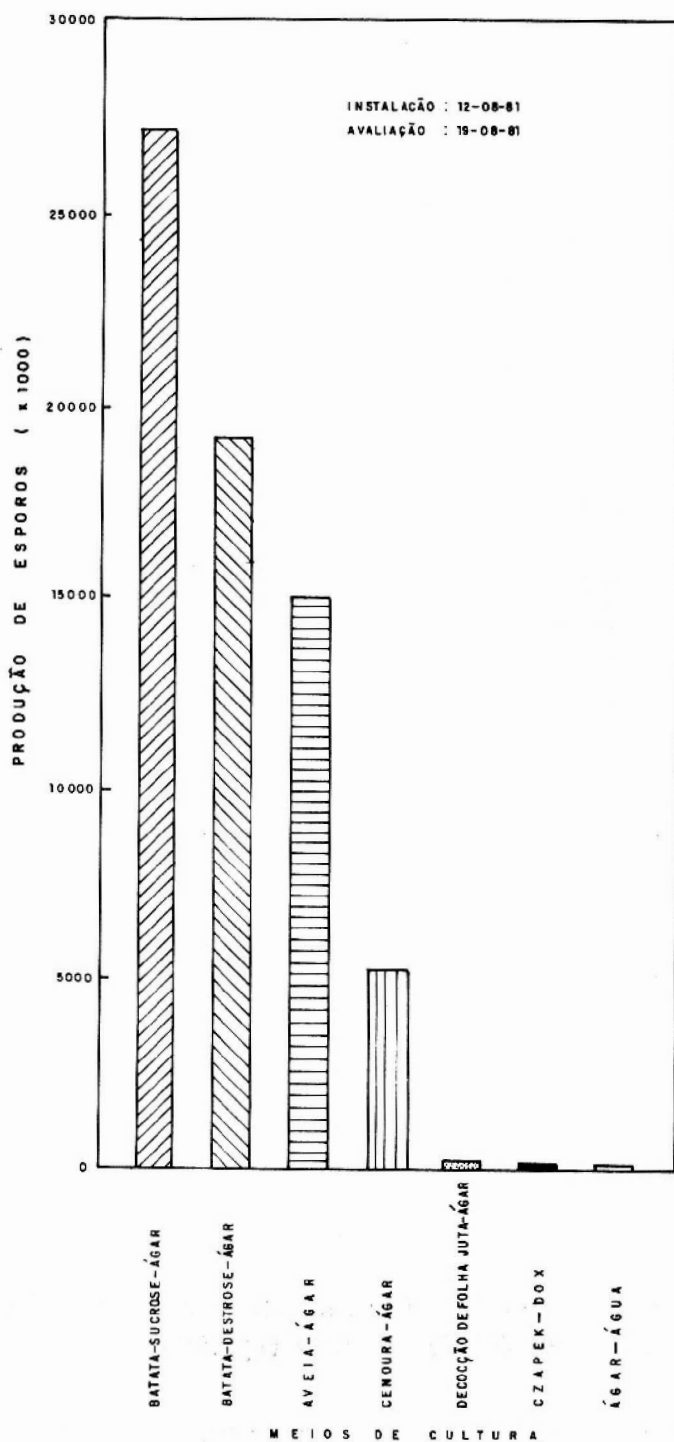


FIG. 2 — Efeito de diferentes meios de cultura na esporulação de *C. corchorum* (Média de seis repetições).

Foram observadas diferenças altamente significativas ao nível de 1% de probabilidade, quando as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. BSA, foi o meio de cultura que proporcionou melhores condições nutricionais para promover a esporulação do fungo, diferindo estatisticamente dos demais (Fig. 2).

Efeito de diferentes níveis de pH do meio de cultura

O nível de pH do meio de cultura não teve muita influência no crescimento radial de colônias de **C. corchorum**. Os resultados obtidos indicaram que os níveis que mais favoreceram o crescimento radial, em ordem decrescente foram pH 5,5, 6,0 e 6,5, seguidos de 5,0, 7,0 e 4,5 (Fig. 2). O nível de pH 5,0 foi apenas ligeiramente superior aos demais. A análise da variância revelou diferenças significativas, quando compararam-se as médias dos tratamentos, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Os tratamentos pH 5,5, 6,0 e 6,5 não apresentaram diferenças significativas entre si, mas diferiram dos demais tratamentos. O nível de pH 4,5 foi o que menos favoreceu o crescimento radial (Fig. 3).

Quando se analisa os dados de produção de esporos, observa-se que os níveis de pH que mais favoreceram a esporulação foram pH 5,5 e 6,0, seguidos de 5,0, 6,5, 7,0 e 4,5. Os níveis que menos favoreceram a esporulação foram pH 7,0 e 4,5 (Fig. 4). Observou-se diferenças altamente significativas ao nível de 1% de probabilidade, quando empregou-se o teste de Tukey para comparar as médias dos diferentes tratamentos. Não houve diferença significativa entre os níveis de pH 5,5 e 6,0, entretanto, estes diferiram dos demais; os níveis de pH 5,0 e 6,5 não diferiram entre si, do mesmo modo que os níveis de pH 4,5 e 7,0. O menor índice de esporulação foi observado quando as colônias desenvolveram-se no meio de cultura com nível de pH 4,5 (Fig. 4).

Influência de diferentes regimes de luz

Na Fig. 5, observa-se que os três regimes luminosos testados tiveram efeito semelhante sobre o crescimento radial. O regime contínuo de luz foi ligeiramente superior ao de luz alternada e este, por outro lado, foi ligeiramente superior ao regime contínuo de escuro. Diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade, foram

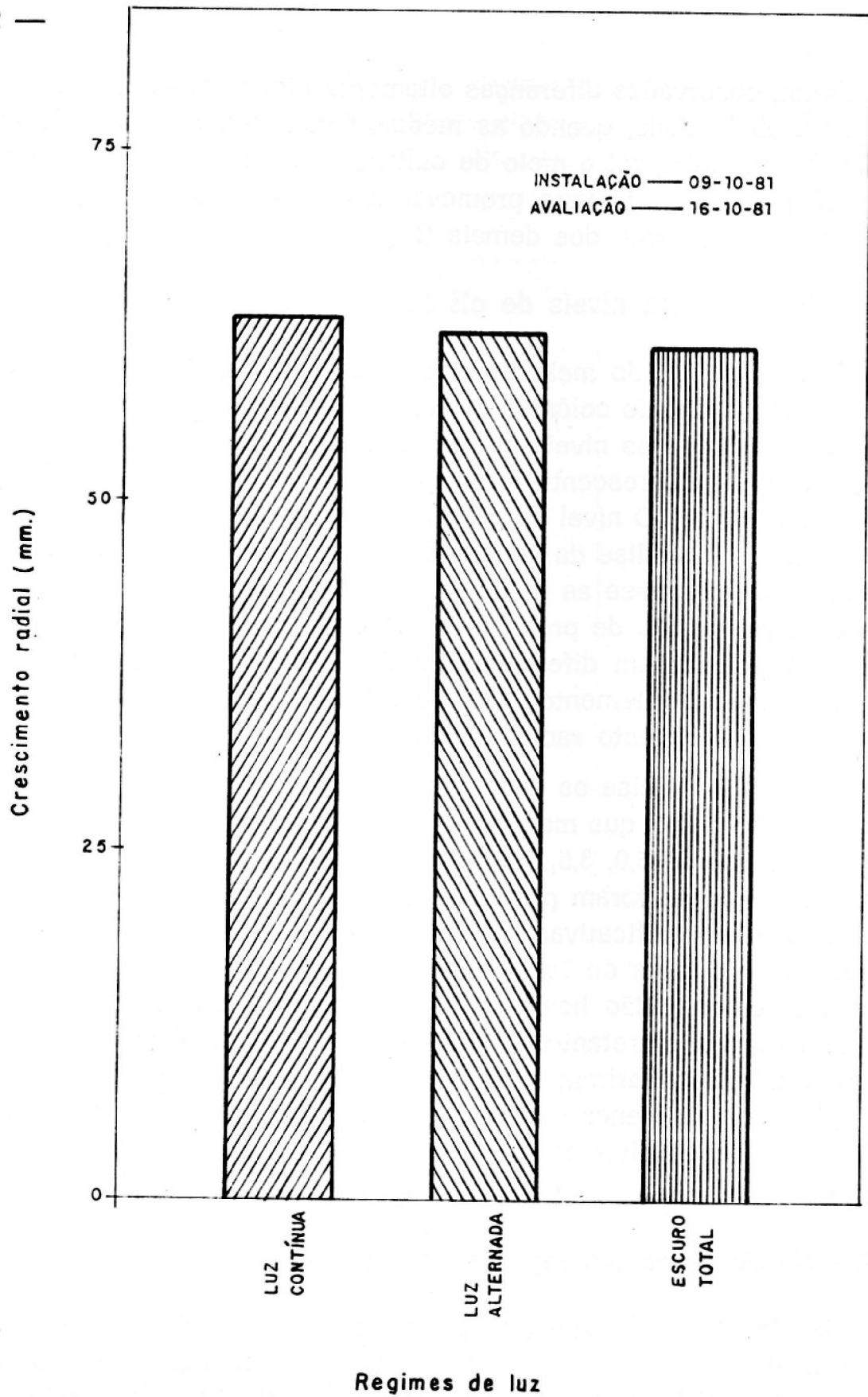


FIG. 3 — Crescimento radial de colônias de *C. corchorum* cultivadas por oito dias em batata-sucrose-ágar com diferentes níveis de pH (Média de sete repetições).

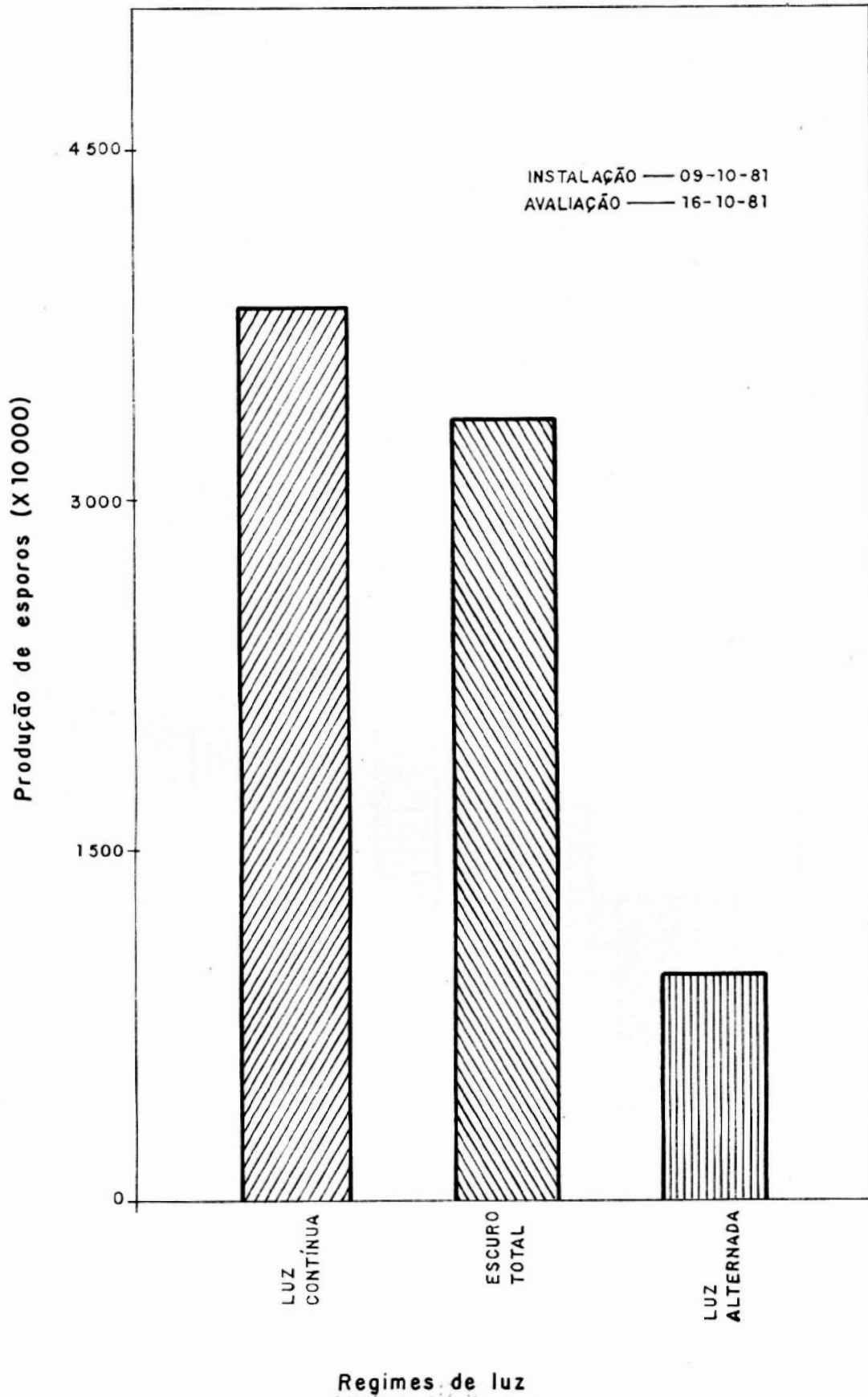


FIG. 4 — Esporulação de *C. corchorum*, quando cultivada em batata-sucrose-ágar com diferentes níveis de pH (Média de sete repetições).

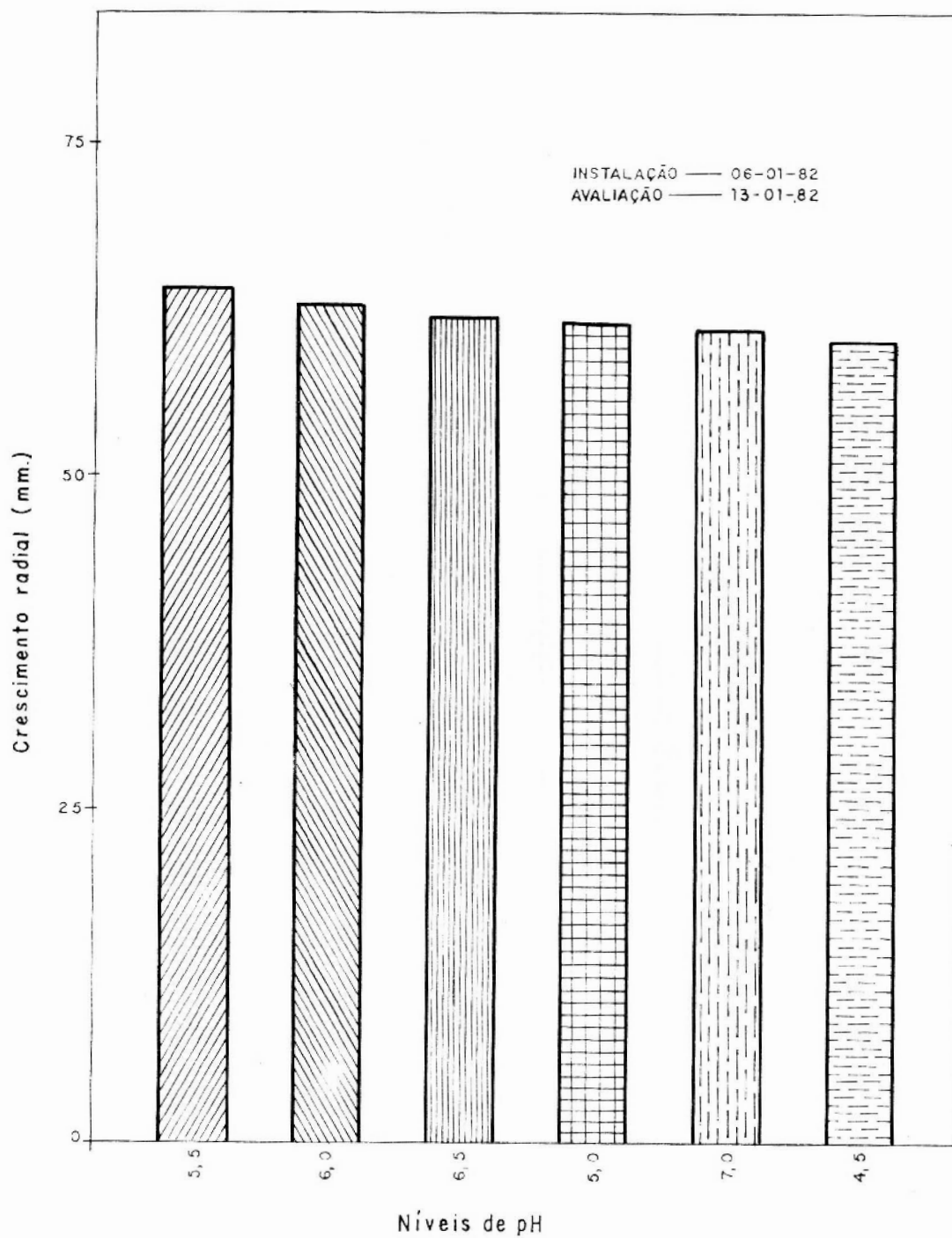


FIG. 5 — Crescimento radial de colônias de *C. corchorum* desenvolvidas por oito dias em meio de cultura batata-súcrose-ágar, sob três regimes luminosos (Média de dez repetições).

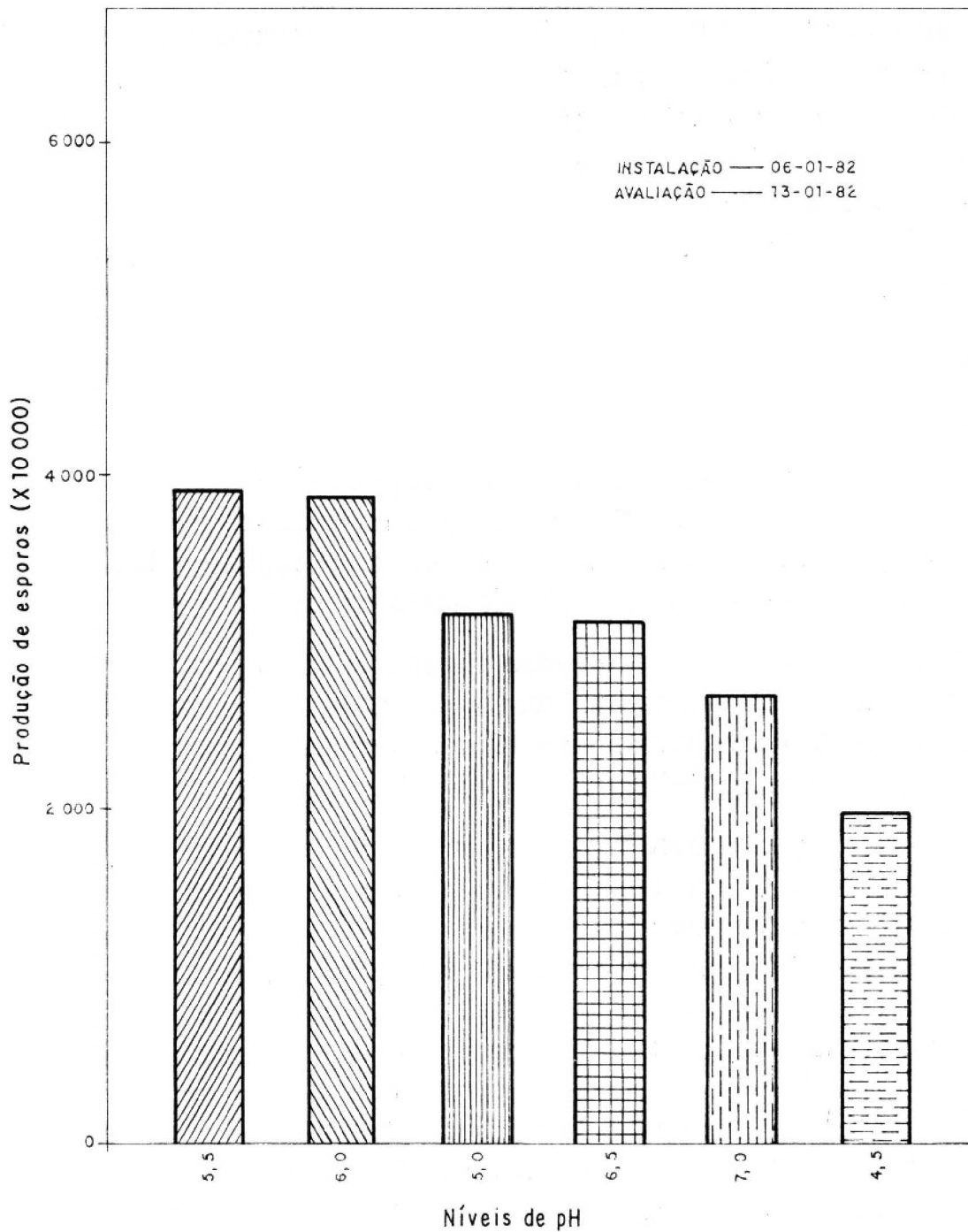


FIG. 6 — Esporulação observada em colônias de **C. corchorum** cultivadas por oito dias em batata-sucrose-ágar sob três regimes luminosos (Média de dez repetições).

observadas quando as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Os regimes contínuos de luz e alternado de doze horas de luz e doze de escuro não diferiram entre si, mas, ambos diferiram do regime contínuo de escuro. Se os regimes luminosos tiveram efeito semelhante sobre o crescimento radial, o mesmo não ocorreu quando analisa-se os dados de produção de esporos. O regime contínuo de luz foi o que mais favoreceu a esporulação, vindo em seguida, o regime contínuo de escuro. O regime luminoso que menos favoreceu a esporulação foi o alternado de doze horas de luz e doze horas de escuro (Fig. 6). Houve diferença altamente significativa ao nível de 1% de probabilidade. O regime contínuo de luz diferiu do regime contínuo de escuro.

DISCUSSÃO

O estudo das características fisiológicas de **Colletotrichum corchorum** Ikata & Tana revelou diferenças no crescimento radial e na esporulação em diferentes meios de cultura, regimes luminosos e concentrações de íon hidrogênio do meio de cultura.

Os meios de cultura testados tiveram efeito sobre o crescimento radial, mas os regimes luminosos e as concentrações de íon hidrogênio do meio de cultura pouco influenciaram no crescimento radial. Já a esporulação foi influenciada por estes três fatores.

Cenoura-ágar embora tenha favorecido o crescimento radial, apresentando-se um pouco superior aos demais meios de cultura testados, não teve o mesmo efeito sobre a esporulação. Já o BSA, embora tenha sido ligeiramente inferior a cenoura-ágar, em induzir o crescimento radial, foi o meio de cultura que induziu maior esporulação (Fig. 1). A maior produção de esporos observada em BSA pode ter ocorrido devido à presença de sucrose, neste meio de cultura. Ray & Purkayastha (1977) testando várias fontes de carbono observaram que a sucrose e o manitol foram as fontes de carbono mais favoráveis em induzir o crescimento e a esporulação de **C. corchorum**.

C. corchorum cresceu e esporulou melhor quando cultivado em BSA com nível de pH 5,5 - 6,0. Ray & Purkayastha (1977) embora não tenham estudado o efeito do pH na esporulação, notaram que em re-

lação à germinação dos esporos, **C. corchorum** germinou em meio de cultura com níveis de pH de 5,0 - 8,0 e que o maior índice de germinação ocorreu em pH 5,5 (84,12%). Em nível de pH 8,0, o fungo germinou relativamente bem (71,75%). Nas condições do presente ensaio, **C. corchorum** apresentou menor índice de esporulação quando cultivado em BSA com nível de pH 4,5 e 7,0.

O fato de **C. corchorum** crescer e esporular bem quando cultivado em meio de cultura com nível de pH 5,5 - 6,0 e ter o crescimento e a esporulação reduzida em pH 4,5 e 7,0 indica que o patógeno não cresce nem esporula bem em meios de cultura de reação neutra ou ácida, preferindo aqueles ligeiramente ácidos ou próximos à neutralidade. O comportamento fisiológico de **C. corchorum** em relação à concentração de íons hidrogênio do meio de cultura foi semelhante à grande maioria dos fungos patogênicos (Makambka 1978, Dorozkhin et al. 1978, Malca et al. 1966).

Os três regimes luminosos a que foram submetidas as colônias de **C. corchorum** tiveram diferentes efeitos sobre a esporulação, mas, pouco influenciaram o crescimento radial. A produção elevada de esporos, observada quando as colônias do fungo foram mantidas em regime contínuo de luz, evidencia a importância deste fator ambiental, principalmente na esporulação. Ray & Purkayastha (1977), embora não tenham estudado a influência deste fator na esporulação de **C. corchorum**, observaram que a germinação dos esporos e o alongamento do tubo germinativo foram maiores na presença do que na ausência de luz. Os efeitos, benéfico da luz e inibitório do escuro na esporulação de diferentes patógenos, já foram observados por vários pesquisadores (Makambka 1978; Ekpo & Esuruoso 1978; Suryanarayanan & Swamy 1977, Bhana & Balasubramanian 1977).

Embora **C. corchorum** seja considerado um patógeno cuja esporulação é fotoinduzida, nas condições do ensaio, em regime contínuo de escuro, o fungo esporulou relativamente bem (Fig. 4). Em regime alternado de doze horas de luz e doze horas de escuro, a esporulação foi inibida.

Foi possível induzir maior crescimento e esporulação de **C. corchorum** quando se cultivou o patógeno em condições ambientais favoráveis. Os resultados dos estudos sobre o efeito de diferentes meios de cultura, regimes luminosos e da concentração de íons hi-

drogênio, indicaram que para se obter maior crescimento e esporulação, colônias de **C. corchorum** devem ser cultivadas em meio de cultura BSA com nível de pH entre 5,5 - 6,0 e mantidas em regime contínuo de luz.

DUARTE, M. de L.R.; NUNES, A.M.L. & ALBUQUERQUE, F.C. de . **Influência de meios de cultura, pH e do regime luminoso no crescimento e esporulação de Colletotrichum corchorum Ikata & Tana.** Belém, EMBRAPA-CPATU. 19p. (EMBRAPA-CPATU. Boletim de Pesquisa, 48).

ABSTRACT: Assays were conducted under laboratory conditions in an attempt to select culture media, pH level of culture media and light regime for better growth and sporulation of **Colletotrichum corchorum** Ikata & Tana. From culture media tested, carrot root agar (CRA) and potato sucrose agar (PSA) favored radial growth but sporulation was more plentiful in PSA medium. The pathogen grew and sporulated very well when colonies were cultivated in PSA medium with pH levels of 5.5 and 6.0. Colonies submitted to continuous light regime had better growth and sporulation when compared with those under continuous darkness and those under 12 hours light alternated with 12 hours darkness.

REFERÊNCIAS

- BHAMA, K.S. & BALASUBRAMANIAN, R. Photoinduced conidiation in **Alternaria macrospora** Zinn and **Colletotrichum gomphrenae** Rao & Saloni. **Curr. Sci.**, 46 (6): 196, 1977.
- CHOUHDURY, M. & AHMED, A.A. Physiologic specialization of **Colletotrichum corchori** Ikata & Yoshida, the causal organism of anthracnose of jute (**Corchorus capsularis**). **Mycopathol. and Mycol. appl.**, 38 (1-2): 161-8, 1969.
- DANTAS, B. **Relatório Anual da Seção de Fitopatologia do Instituto Agrônomo do Norte.** Belém, IAN. 1948. 129p. (não publicado).
- DOROZKHIN, N.A.; BONDAR, L.V. & KONOVALOVA, N.A. Effect of media on the growth and sporulation of strains of **Venturia inaequalis** (Cke) Wint. **R. Plant Pathol.**, 57 (4): 152, 1978 (resumo).
- EKPO, E.J.A. & ESURUOSO, O.F. Growth and sporulation of **Cercospora cruenta** and **Cercospora canescens** in culture. **Canad. J. Bot.**, 56 (3): 229-33, 1978.

- FREIRE, F.C.O. & ALBUQUERQUE, F.C. Mancha preta da juta (*Corchorus capsularis* L.) causada por *Colletotrichum corchorum* Ikata & Tana. **Fitopatof. bras.**, 3 (2): 169-74, 1978.
- GHOSH, T. Anthracnose of jute. **Indian Phytopathol.**, 10: 63-70, 1957.
- IKATA, S. & YOSHIDA, M. A new anthracnose of jute plant. **Ann. of Phytopathol. Soc. Japan.** 10: 141-9, 1940.
- LIBONATI, V.F. **A juta na Amazônia.** Belém, IAN, 1958. 83p. IAN. (Boletim Técnico, 34).
- MAKAMBKA, C. Morphogenesis of *Rosellinia* spp. **R. Plant Pathol.**, 57 (11): 436, 1978. (resumo).
- MALCA, D.C.; ERWIN, W.M. & JONES, B. Effect of pH, carbon and nitrogen sources on the growth of *Verticillium albo-atrum*. **Phytopathology.** 56: 401-6, 1966.
- PURKAYASTHA, R.P. & RAY, C. The detection of phytoalexins in jute leaves after infection by *Colletotrichum corchorum* and their possible role in lesions development. **Physiol. Plant Pathol.**, 6 (3): 265-73. 1975.
- PURKAYASTHA, R.P. & RAY, C. Effect of foliar application of plant hormones and mineral nutrition of host on the development of anthracnose disease of jute. **R. Plant Pathol.**, 56 (11): 1013, 1977. (resumo).
- RAY, C. & PURKAYASTHA, R.P. Some physiological studies on *Colletotrichum corchorum* causing anthracnose on jute. **Indian Phytopathol.**, 30: 87-93, 1977.
- SURYANARAYANAN, T.S. & SWAMY, R.A. Influence of method of inoculation on sporulation of some light-requiring fungi. **Curr. Sci.**, 46 (10): 347-8, 1977.
- TUITE, J. **Plant pathological methods.** Minneapolis, Burgness, 1969. 239p.