



CRESCIMENTO MICELIAL E ESPORULAÇÃO DE *RAMULARIA AREOLA* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Juliano Cesar da Silva¹; Wagner Bettiol²; Rafael Galbieri³.

¹ UNESP - Botucatu; ² Embrapa Meio Ambiente;

³ Instituto Mato-grossense do Algodão.

RESUMO – A Mancha-de-Ramularia do algodoeiro, causada por *Ramularia areola*, nos últimos anos, passou a ocorrer mais cedo e a causar desfolha prematura, implicando na necessidade de aplicações de fungicidas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de diferentes meios de cultura no crescimento micelial e na esporulação de *Ramularia areola* isolado IMA 244. Foram avaliados os seguintes meios de cultura: V8, Extrato de malte (EM), Batata-Dextrose-Ágar (BDA), Kirchoff modificado, Dextrose-Peptona-Ágar, Meio de Arroz e Meio de Arroz modificado. Para avaliar o crescimento micelial, no centro de cada placa, contendo meio de cultura, foi colocado um disco de micélio do fungo. Após 7, 14, 21 e 28 dias de incubação (fotoperíodo de 12 h e 25 °C) foram realizadas avaliações do crescimento micelial. Para avaliar a esporulação, uma suspensão de conídios foi distribuída na superfície dos meios de cultura. Após 7 e 14 dias foram realizadas avaliações da esporulação, utilizando câmara de Neubauer. *Ramularia areola*, isolado IMA 244, apresentou o maior crescimento micelial em meio de cultura EM e V8; e a maior esporulação em meio de cultura EM, aos 7 dias de cultivo.

Palavras-chave: *Ramularia areola*; Algodoeiro; Meio de cultura; Crescimento micelial;

INTRODUÇÃO

cultura do algodoeiro ocorrem diversas doenças, destacando-se a Mancha-de-Ramulária, causada pelo fungo *Ramularia areola*. No Brasil, a Mancha-de-Ramulária historicamente sempre foi considerada uma doença secundária, que ocorria no final do ciclo e auxiliava na desfolha da planta (CIA, 1977; CIA; SALGADO, 1997). Entretanto, a partir do ano de 1998, com o incremento da área cultivada, monocultivo e a utilização de cultivares suscetíveis à doença, a Mancha-de-Ramulária passou a ocorrer mais cedo e a causar desfolha prematura, implicando na necessidade de aplicações de fungicidas (SUASSUNA et al., 2006; CHITARRA, 2008). A doença tem início, geralmente, em lavouras bem desenvolvidas, em locais mais sombreados e úmidos. Em situações de alta severidade as lesões coalescem, ocupando quase todo o limbo foliar, tornando-se necrosadas após o período de esporulação do patógeno (Ehrlinch e Wolf, 1932), causando a defolha prematura e a redução da área fotossintética ativa da planta, resultando na redução do potencial produtivo e na qualidade da fibra (ZAMBIASI; BELOT, 2007).

Devido a importância econômica da Mancha-de-Ramularia do algodoeiro, torna-se necessário conhecer o desenvolvimento de *Ramularia areola* em meio de cultura. Menten e Marques (1979) verificaram que o isolado de *Ramularia tulasnei* apresentou ótimo crescimento micelial em batata-dextrose-extrato de levedura-ágar (BDLA). A melhor esporulação foi verificada em Batata-Dextrose-Ágar (BDA), quando o fungo foi cultivado a 25 °C, independente do regime de luz. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de diferentes meios de cultura no crescimento micelial e na esporulação de *Ramularia areola*.

METODOLOGIA

O isolado IMA 244 foi obtido de plantas de algodoeiro, localizadas no Município de Montividiú, GO. Para multiplicação, 100 µL de uma suspensão de conídios (10^6 conídios mL⁻¹) do fungo foi transferida para o meio de cultura V8 e incubado por sete dias, sob luz contínua e temperatura de 25 °C. Após sete dias foi obtida uma suspensão de conídios para a realização dos estudos.

Foram avaliados os seguintes meios de cultura:

V8 – 100 mL de V8, CaCO₃ 2 g, ágar 20 g e água 1000 mL.

Extrato de malte (EM) – Extrato de malte 20 g, ágar 20 g e água 1000 mL.

Batata-dextrose-ágar (BDA) – 18 g de BDA da Neogen Corporation, Lansing, Michigan e 1000 mL.

Kirchoff modificado (KMM) – dextrose 30 g, asparagina 0,5 g, sulfato de potássio 1,0 g, sulfato de magnésio 0,5 g, ágar 20 g e água 1000 mL.

Dextrose-peptona-ágar (DPA) – dextrose 10 g, peptona 2 g, KH₂PO₄ 0,5 g, MgSO₄.7H₂O 0,5 g, ágar 20 g e água 1000 mL.

Meio de Arroz (MA) – Arroz triturado 15 g, peptona 20 g, ágar 20 g, água 1000 mL.

Meio de Arroz modificado (MAM) - Arroz triturado 15 g, ágar 20 g, água 1000 mL.

Produção de conídios de *Ramularia areola* isolado IMA 244.

Em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo colônias fúngicas, foram adicionados 2000 µL de água destilada autoclavada e com o auxílio de uma alça de Drigalski foi realizada a raspagem da

superfície do meio de cultura, visando a liberação dos conídios. A suspensão de conídios foi ajustada para 10^6 conídios mL^{-1} , com o auxílio de uma câmara de Neubauer. Para avaliar a esporulação nos diferentes meios de cultura, em cada placa de Petri foram adicionados 100 μL da suspensão de conídios, sendo logo em seguida, distribuída sobre a superfície do meio de cultura com o auxílio de uma alça de Drigalski. Essa metodologia foi proposta por Nemeç (1969, 1971). O fungo foi incubado por 14 dias à temperatura de 25 °C, sob condição de luz contínua. As avaliações foram realizadas aos 7 e 14 dias de cultivo. Para determinar a esporulação foi utilizado o método de diluição seriada e contagem em câmara de Neubauer. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, sendo utilizadas cinco repetições/tratamento.

Crescimento micelial de *Ramularia areola* isolado IMA 244

Em meio de cultura V8, contendo colônias fúngicas em pleno desenvolvimento, foram obtidos discos de 1 cm de diâmetro com auxílio de furador de rolha. No centro de cada placa de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo os meios de cultura, foi adicionado um disco com as estruturas do patógeno. O fungo foi incubado por 28 dias à temperatura de 25 °C, sob condição de luz contínua. As avaliações foram realizadas aos 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo. Para determinar o crescimento micelial foi mensurado o diâmetro da colônia com o auxílio de uma régua. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo utilizadas 10 repetições/tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O maior crescimento micelial de *Ramularia areola* isolado IMA 244 foi obtido em meio de cultura Extrato de Malte (2%) e V8, seguido de BDA, quando comparados com os demais tratamentos (Figura 1). Segundo Crous (2009), o meio de cultura Extrato de Malte 2% é recomendado para a realização de estudos morfológicos de fungos do gênero *Mycosphaerella*, pois as características da colônia e a morfologia de ascósporos são geralmente consistentes *in vitro*. Também Menten e Marques (1979) verificaram que o isolado de *Ramularia tulasnei* apresentou o maior crescimento micelial em BDLA.

Utilizando a transferência de uma suspensão de esporos, nos estudos para avaliar a esporulação do fungo, o isolado IMA 244 apresentou melhor esporulação no meio de cultura Extrato de malte (2%) aos sete dias de cultivo (Figura 2). Menten e Marques (1979) verificaram que o isolado de *Ramularia tulasnei* apresentou a melhor esporulação em meio de cultura BDA, após 16 dias de incubação quando cultivado à 25 °C, independente do regime de luz.

CONCLUSÃO

- Extrato de Malte a 2% e V8 proporcionaram o maior crescimento micelial de *Ramularia areola* aos 28 dias de cultivo.

- Extrato de Malte a 2% proporcionou a maior esporulação de *Ramularia areola* aos sete dias de incubação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CIA, E. Ocorrência e conhecimento das doenças de algodoeiro anual *Gossypium hirsutum* L. no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 3. p. 167-193, 1977.

CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Org.). **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 1997. v. 2, p. 33-48.

CHITARRA, L. G. **Identificação e controle das principais doenças do algodoeiro**. 2. ed. Embrapa Algodão: Campina Grande, 2008. 84 p.

CROUS, P. W. Taxonomy and phylogeny of the genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. **Fungal Diversity**, v. 38, p. 1-24, 2008.

EHRlich, J.; WOLF, F. A. Areolate mildew of cotton. **Phytopathology**, v. 22. p. 229-240, 1932.

MENTEN, J. O. M.; MARQUES. Influência do inóculo, meio de cultura e regime de luz no desenvolvimento micelial e esporulação de *Mycosphaerella fragariae* (Tul.) Lind. (*Ramularia tulasnei* Sacc.). **Fitopatologia Brasileira**, v. 4, p. 63-71, 1979.

NEMEC, S. Determination of leaf spot races in Southern Illinois strawberry plantings. **Plant. Dis. Rep.**, v. 53, p. 94-97, 1969.

NEMEC, S. Studies on resistance of strawberry varieties and selections to *Mycosphaerella fragariae* in Southern Illinois. **Plant Dis. Rep.**, v. 5 p. 573-576, 1971.

SUASSUNA, N. D.; COUTINHO, W. M.; FERREIRA, A. C. B. **Manejo da mancha de *Ramularia* em algodoeiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 4 p. (Embrapa Algodão. Comunicado Técnico 272).

ZAMBIASE, T. C.; BELOT, J. L. **Manual de identificação de doenças do algodoeiro**. Cascavel, PR: Coodetec, 2005. 70 p.

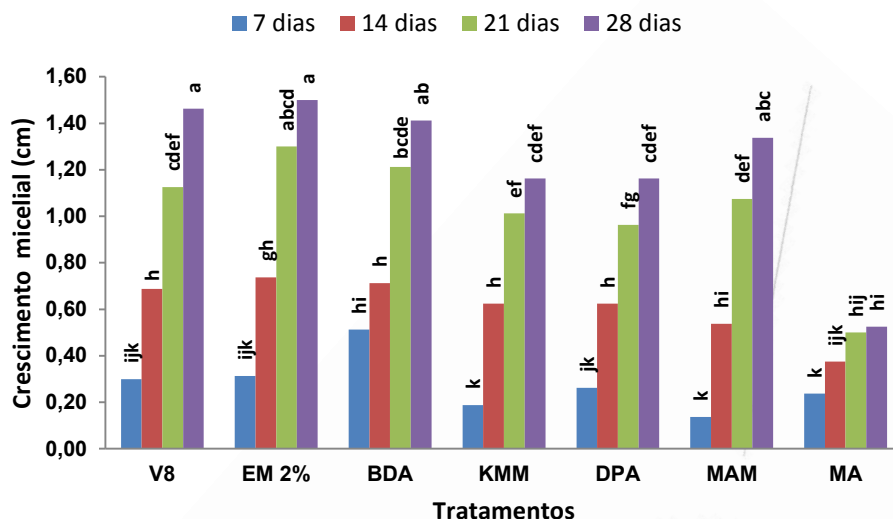


Figura 1. Efeito do meio de cultura no crescimento micelial (cm) de *Ramularia areola* isolado IMA 244 aos 7, 14 e 21 dias de incubação. Meios de cultura: V8, BDA = batata-dextrose-água, KMM = Kirchoff modificado DPA = Dextrose-peptona-água, MAM = Meio de Arroz modificado e MA = Meio de Arroz.

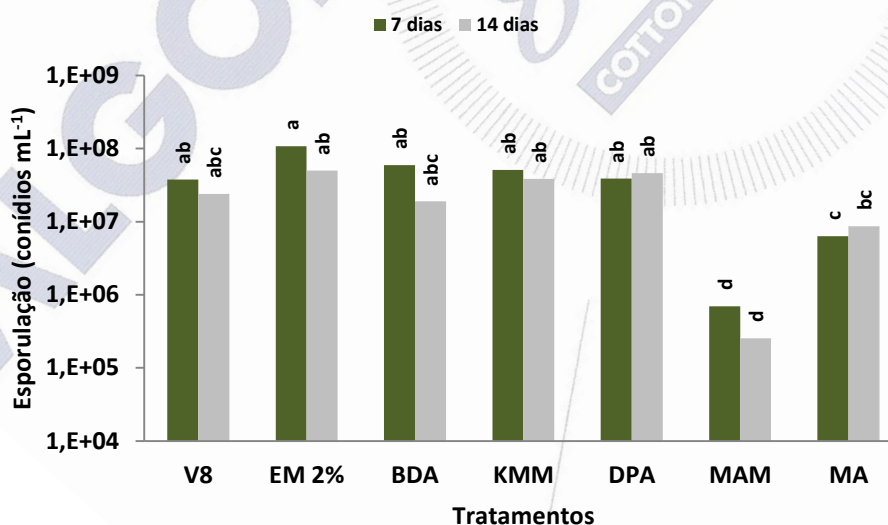


Figura 2. Efeito do meio de cultura na esporulação (conídios mL⁻¹) de *Ramularia areola* isolado IMA 244 aos 7 e 14 dias de incubação. Meios de cultura: V8, BDA = batata-dextrose-água, KMM = Kirchoff modificado, DPA = Dextrose-peptona-água, MAM = Meio de Arroz modificado e MA = Meio de Arroz.