



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DO PARÁ  
UNIDADE DE APOIO À PESQUISA E À PÓS-GRADUAÇÃO  
EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL

**XII** SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO  
CIENTÍFICA DA FCAP

**VI** SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO  
CIENTÍFICA DA EMBRAPA  
AMAZÔNIA ORIENTAL

10 a 12 de Dezembro 2002  
CAMPUS DA FCAP - BELÉM - PARÁ



**A CONTRIBUIÇÃO DO PROFISSIONAL DE CIÊNCIAS  
AGRÁRIAS NO USO E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE**

**ANAIS**

# ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E FISIOLÓGICAS DE *Fusarium oxysporum* AGENTE CAUSAL DA MURCHA AMARELA DA PIMENTA-DO-REINO.

LIMA, André Oliveira<sup>1</sup> & DUARTE, Maria de Lourdes Reis<sup>2</sup>

## INTRODUÇÃO

Uma nova doença vem afetando, principalmente, a cultivar Guajarina no Estado do Pará, desde 1992 (Duarte *et al.*, 1997). Os sintomas externos da doença são muito parecidos com os da fusariose, o que confunde os produtores, favorecendo a dispersão. O patógeno causador desta nova doença foi identificado como o *Fusarium oxysporum*. Este fungo penetra na planta através das raízes, favorecido ou não, por ferimentos existentes na mesma. Posteriormente, ele invade o sistema vascular causando o escurecimento e impedindo a absorção e circulação de água e nutrientes. Esta necrose vascular, inicialmente unilateral, estende-se até as nervuras das folhas dos ramos apicais, resultando na murcha rápida e morte das plantas. As plantas infectadas, antes de entrarem em colapso, apresentam-se amarelecidas com queda de folhas e de entrenós, sendo denominada pelos produtores de murcha amarela (Duarte *et al.*, 1999).

O *Fusarium oxysporum* é um fungo de solo que infecta vários hospedeiros de diferentes famílias botânicas. Espécies pertencentes a esse grupo de fungos são muito específicas, infectando muitas vezes uma só espécie de planta ou várias espécies de mesma família botânica. A origem dessa *forma specialis* ainda não está bem definida uma vez que não foram observadas piperáceas nativas infectadas pelo patógeno, assim como, a doença só tem sido observada infectando pimenteiras no Estado do Pará. O controle da murcha causada por esse patógeno, em outros hospedeiros, tem sido feito por meio de cultivares resistentes, práticas culturais associadas à aplicação de fungicidas e, através de agentes de biocontrole (Papavizas & Lumsden, 1980).

Como a doença vem se espalhando progressivamente em vários municípios do Estado do Pará, há necessidade de se estudar com mais detalhes alguns aspectos da biologia do fungo e a forma de dispersão da doença para que as medidas de controle recomendadas aos produtores sejam mais efetivas a fim de deter o avanço da murcha amarela nas áreas produtoras de pimenta-do-reino.

O presente trabalho teve como objetivos, estabelecer as condições adequadas para promover um bom crescimento e esporulação do patógeno a fim de selecionar material resistente à doença sob condições controladas e, estudar algumas características morfológicas e fisiológicas do patógeno causador da murcha amarela na pimenta-do-reino.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos em condições de laboratório, os seguintes experimentos:

**Experimento 01 - Seleção de meios de cultura adequados (para induzir o crescimento e esporulação de *Fusarium oxysporum*)** – Foram preparados os meios de cultura BDA, BSA, meio de Sabouraud, Richard, V-8-ágar. Cerca de 20ml de cada meio foram distribuídos em placas de Petri na câmara de fluxo laminar. Após a solidificação dos meios de cultura, um disco de 5 mm retirado da periferia de colônias de *Fusarium oxysporum* com 5 dias de desenvolvimento, foi transferido para o centro de cada uma das placas, tendo sido usado um disco por placa. As placas foram seladas com “cling film” (tipo Filmito), etiquetadas e mantidas em uma incubadora. Na superfície inferior das placas foram feitas retas perpendiculares de modo a cortar o disco centralmente. A partir de 24 horas após, foram feitas medições diárias com o auxílio de régua e lupa, do crescimento linear das colônias, de acordo com Trinci (1969), até 120 horas, expressa em centímetros. Como as colônias do fungo só começaram a produzir esporos a partir do oitavo dia de crescimento, no décimo dia foram preparadas as suspensões de esporos de cada parcela do experimento, adicionando-se 8ml de água destilada esterilizada em cada placa. Com um pincel esfregou-se a superfície da colônia e com uma micropipeta foi aspirada a suspensão de esporo, a qual foi transferida para frascos de 20ml. Como as contagens da densidade de inóculo foram feitas por um período prolongado, para prevenir a germinação dos esporos, foram adicionadas 3 gotas de HgCl<sub>2</sub> (bicloreto de mercúrio), com o objetivo de matar os esporos. Antes de iniciar a contagem do número de esporos por mililitro, a suspensão de esporos foi agitada e com o auxílio de uma micropipeta, cerca de 1 ml foi vertida na canaleta da câmara de Neubauer (hemacitômetro). Uma lamínula de 0,04 mm de espessura foi colocada sobre a escala para exame sob o microscópio óptico. Quando as suspensões se apresentavam muito concentradas, o que impedia a contagem, foi necessário fazer a diluição retirando-se 1 ml da solução e transferindo-se para outro tubo de ensaio contendo 9 ml de água destilada e esterilizada, e feita nova contagem de esporos. Caso continuasse concentrada, fazia-se uma nova diluição da solução. No final da contagem, o número de esporos registrado era multiplicado pela diluição para se obter a concentração final de esporos na suspensão original. Ao final de cada experimento os dados obtidos foram analisados estatisticamente e as médias comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância.

<sup>1</sup> Bolsista do PIBIC/CNPq/EMBRAPA Acadêmico do 7º semestre do Curso de Agronomia FCAP – Belém, PA.

<sup>2</sup> Fitopatologista, Ph.D., Embrapa Amazônia Oriental.

**Experimento 02 - Efeito do pH do meio de cultura no crescimento e esporulação de *Fusarium oxysporum*** - Cerca 800 ml do meio de cultura BSA (batata-sucrose-ágar), selecionado no experimento 01, foram divididos em alíquotas de 100 ml. O pH de cada alíquota foi ajustado com gotas de NaOH ou HCl para atingir o nível final de 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0. O tratamento controle correspondeu ao pH normal do meio de cultura (pH 6,8). Após a esterilização, os meios de cultura foram distribuídos em placas de Petri e incubados em câmara de crescimento sob as mesmas condições do experimento 01. Os métodos de avaliação e a análise dos dados registrados foram os mesmos usados no experimento 01.

**Experimento 03 - Efeito da temperatura no crescimento e esporulação do *Fusarium oxysporum*** - Placas contendo o meio de cultura inoculadas com um disco de micélio do patógeno foram incubadas à temperaturas de 13 °C, 18 °C, 23 °C, 28 °C e 33 °C, sob iluminação. As parcelas do tratamento Testemunha foram incubadas à temperatura ambiente, do laboratório. Os métodos de avaliação e de análise dos dados foram os mesmos usados nos experimentos anteriores.

**Experimento 04 - Efeito da luz no crescimento e esporulação do *Fusarium oxysporum*** - Placas de Petri contendo 20 ml de meio de cultura BSA esterilizado, inoculadas com um disco de colônias de *F. oxysporum* foram incubadas a 25 °C sob 24 horas de luz, 12 horas luz/12 horas escuro, 24 horas de escuro e sob luz difusa no ambiente do laboratório. Os métodos de avaliação e a análise dos dados registrados foram os mesmos usados no experimento 01.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento 01, O patógeno apresentou variações na aparência das colônias quando cultivado nos diferentes meios de cultura testados. A medição diária das colônias revelou que o patógeno apresentou uma taxa de crescimento diário de 1,17 cm/dia. Houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,01$ ). O patógeno apresentou maior velocidade de crescimento nos meios de cultura V-8 ágar e BSA. A contagem do número de esporos produzidos em diferentes meios de cultura revelou que o mais eficiente em induzir a esporulação de *Fusarium oxysporum* foi V-8 ágar seguido de Richard (Tabela 1). Embora o meio de cultura V8-ágar tenha favorecido o crescimento e esporulação, o aspecto translúcido das colônias dificultou o registro dos dados de crescimento.

**Tabela 1.** Efeito de diferentes meios de cultura no crescimento linear e na indução da esporulação de culturas de *Fusarium oxysporum* (Média de 10 repetições).

| Meios de cultura           | Crescimento linear das colônias (cm) | Densidade de inóculo (ufc/ml) |
|----------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| V-8 ágar                   | 3,78 a                               | $9,3 \times 10^6$ a           |
| Batata-sucrose-ágar (BSA)  | 3,70 a                               | $7,5 \times 10^6$ b           |
| Richard solidificado       | 3,37 b                               | $8,6 \times 10^6$ a           |
| Batata-dextrose-ágar (BDA) | 3,32 b                               | $7,4 \times 10^6$ b           |
| Sabouraud                  | 2,17 c                               | $1,8 \times 10^6$ c           |

Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey no nível de 5% ( $p < 0,01$ )

No experimento 02, A medição diária das colônias revelou que o patógeno apresentou uma taxa de crescimento diário de 1,88 cm/dia, Houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,01$ ). O patógeno apresentou maior velocidade de crescimento nos meios de cultura com os pH 7,0; 6,5 e o pH testemunha 6,8 (Tabela 2). A contagem do número de esporos produzidos em diferentes pH revelou que não houve diferença significativa entre os tratamentos. Não foi possível trabalhar com os tratamentos de pH 4,0 e 4,5 devido a não solidificação dos meios de cultura desses tratamentos.

**Tabela 2.** Efeito de diferentes pH no crescimento linear de culturas de *Fusarium oxysporum* (Média de 5 repetições).

| Tratamentos   | Crescimento linear das colônias (cm) |
|---------------|--------------------------------------|
| pH 7,0        | 3,51 a                               |
| pH 6,5        | 3,44 a                               |
| pH testemunha | 3,40 a                               |
| pH 6,0        | 3,19 b                               |
| pH 5,5        | 2,80 c                               |
| pH 5,0        | 2,40 d                               |

Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey no nível de 5% ( $p < 0,01$ )

No experimento 03, A medição diária das colônias revelou que o patógeno apresentou uma taxa de crescimento diário de 1,47 cm/dia. Houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,01$ ). O patógeno apresentou maior velocidade de crescimento nas temperaturas 33° C, 28° C e testemunha. A contagem do número de esporos produzidos em diferentes temperaturas revelou que a mais eficiente em induzir a esporulação de *Fusarium oxysporum* foi a Testemunha seguida de 23° C e 28° C (Tabela 3).

**Tabela 3.** Efeito de diferentes temperaturas na indução da esporulação e no crescimento linear de culturas de *Fusarium oxysporum* (Média de 7 repetições).

| Temperaturas | Densidade de inóculo (ufc/ml) | Crescimento linear das colônias (cm) |
|--------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| Testemunha   | 2,48 x 10 <sup>6</sup> a      | 2,64 a                               |
| 23° C        | 1,45 x 10 <sup>6</sup> a b    | 2,19 b                               |
| 28° C        | 1,30 x 10 <sup>6</sup> a b    | 2,68 a                               |
| 18° C        | 0,12 x 10 <sup>6</sup> b      | 1,23 c                               |
| 13° C        | 0,10 x 10 <sup>6</sup> b      | 0,88 d                               |
| 33° C        | 0,04 x 10 <sup>6</sup> b      | 2,75 a                               |

Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey no nível de 5% (p < 0,01).

No experimento 04, houve diferença significativa entre os tratamentos (p < 0,01). O patógeno apresentou maior velocidade de crescimento nos regimes de 12h de luz/12 horas escuro e 24h de luz/dia. A contagem do número de esporos produzidos em diferentes por colônias submetidas a diferentes regimes de luz revelou que o mais eficiente em induzir a esporulação de *Fusarium oxysporum* foi 24h de luz/dia (Tabela 4).

**Tabela 4.** Efeito de diferentes regimes de luz na indução da esporulação e no crescimento linear de culturas de *Fusarium oxysporum* (Média de 8 repetições).

| Tratamentos             | Densidade de inóculo (ufc/ml) | Crescimento linear das colônias (cm) |
|-------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| 24 h de luz/dia         | 5,14 x 10 <sup>6</sup> a      | 3,81 a                               |
| Testemunha              | 3,68 x 10 <sup>6</sup> a b    | 3,55 b                               |
| Escuro                  | 3,27 x 10 <sup>6</sup> a b    | 3,54 b                               |
| 12 h de luz/12 h escuro | 2,05 x 10 <sup>6</sup> b      | 3,82 a                               |

Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey no nível de 5% (p < 0,01).

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- O meio de cultura V-8 ágar foi mais eficiente em promover o crescimento e esporulação de colônias de *Fusarium oxysporum*
- O fungo *Fusarium oxysporum* apresentou um maior crescimento linear numa faixa de pH que vai de 6,5 a 7,0, mas o pH do meio de cultura não teve influência na esporulação do fungo *Fusarium oxysporum*.
- O fungo *Fusarium oxysporum* apresentou um maior crescimento em temperaturas mais elevadas (33° C). Contudo, em temperaturas muito elevadas a produção de esporos foi inferior à produção de esporos em temperaturas baixas (13°C). Sendo a faixa de temperatura ideal, para o cultivo do fungo entre 23°C e 28°C.
- O regime de 12 h luz/12 h escuro favoreceu o crescimento das colônias de *Fusarium oxysporum*, enquanto o fungo apresentou maior produção de esporos na presença de luz constante.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DUARTE, M. L. R.; ALBUQUERQUE, F. C. **Doenças da pimenta-do-reino** In: VALLE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (eds.) *Controle das doenças das plantas cultivadas - Culturas Industriais*. Viçosa: Imprensa Universitária. 1997. pp. 979-923.

DUARTE, M.L.R., ALBUQUERQUE, F.C., HAMADA, M. & COSTA, A.P.D. Murcha causada por *Fusarium oxysporum*, uma nova doença da pimenta-do-reino no Estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, n.2, p.178-181, 1999.

PAPAVIZAS, G. C.; LUMSDEN, R. D. Biological control of soil-borne fungal propagules. **Annual Review of Phytopathology**, v.18, p. 389-412, 1980.