

Germinação de Conídios de *Penicillium citrinum* sob Diferentes Estresses Abióticos

Germination of Conidia of *Penicillium citrinum* under Different Abiotic Stresses

Jéssica de Souza Lima¹; Leonardo de Oliveira Barbosa²; Ítala Layanne Alves Santos³; Thalita de Freitas Gomes Barbosa³; Herbert Mouse de Lima Targino⁴; Ana Cristina Fermino Soares⁵; Carlos Alberto Tuão Gava⁶

Abstract

The semiarid region of Northeastern Brazil is characterized by hydric deficit, high temperatures and soils with salinity problems. In addition, the scenarios indicate that ongoing climate change will exacerbate these characteristics. As a result, these changes can directly affect the performance of micro-organic biological control agents. The objective of this study was to determine how abiotic stresses such as temperature, salinity, pH and osmotic potential influence the in vitro germination of conidia of *Penicillium citrinum*, a biological control agent of red rot of sisal caused by the fungus *Aspergillus niger*. With the results obtained, there was a tendency to reduce the germination of conidia of *P. citrinum* with increasing temperature and salinity, being limiting for germination only under extreme conditions such as 40 ° C temperature and NaCl concentrations between 8 and 10%. The conidia of *P. citrinum* were not affected by osmotic stress and tested pH levels.

Keywords: Salinity, water stress, biological control, environmental factors.

Introdução

O recente aumento pelo interesse do uso de produtos biológicos em programas de manejo de doenças em plantas tem demandado a seleção de micro-organismos tolerantes às variações ambientais no ecossistema envolvido. Além disso, o cenário de aumento crescente da concentração de CO₂ na atmosfera vem causando alterações de variáveis climáticas como a temperatura e regime pluviométrico. Os impactos destas alterações sobre as populações microbianas e suas interações com as plantas ainda são pouco

¹Doutoranda, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas, BA, jessyka_llima@hotmail.com.

²Mestrando, UFRB, Cruz das Almas, BA.

³Graduandas, Universidade de Pernambuco (UPE), Petrolina, PE.

⁴Mestrando, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina, PE.

⁵Professora, UFRB, Cruz das Almas, BA.

⁶Pesquisador, Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

conhecidos (COMPANT et al., 2010). Assim, a tolerância a estresses abióticos deve se tornar uma característica a ser avaliada nos processos de seleção de agentes de controle biológico (ACBs).

O Brasil é o maior produtor mundial de sisal (*Agave sisalana* Perrine) e o Nordeste é a única região brasileira que tem a possibilidade de ofertar o produto, devido à favorabilidade das suas condições climáticas (ALVARENGA Jr., 2012). Apesar dessa boa adaptação às condições semiáridas do Nordeste brasileiro, o sisal tem sua produtividade afetada por causa da ocorrência da doença denominada podridão vermelha do sisal, causada pelo fungo *Aspergillus niger* (COUTINHO et al., 2006; LIMA et al., 1998).

Não existem produtos químicos registrados para o controle dessa doença, e agentes antagônicos ao *A. niger* em condições de campo são relatados (MAGALHÃES, 2013; SÁ, 2013; SILVA, 2012). Em mudas de sisal, sob condições controladas, o fungo *Penicillium citrinum* controlou em até 100% a podridão vermelha, sendo a produção de metabólitos secundários, possivelmente, um dos mecanismos envolvidos no controle (DAMASCENO, 2012).

Diante disso, o presente estudo investigou a tolerância de conídios de *P. citrinum* aos diferentes estresses abióticos, como temperatura, salinidade, pH e potencial osmótico, próximos ao encontrado na região semiárida, visando à obtenção de informações básicas necessárias ao estudo aplicado da podridão vermelha do sisal.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. *Penicillium citrinum* foi isolado de plantas de sisal e se mostrou efetivo no biocontrole da podridão vermelha em experimentos anteriores (DAMASCENO, 2012). Este isolado pertence à coleção de microorganismos do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da UFRB.

Penicillium citrinum foi cultivado em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), por 10 dias a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Após o período de crescimento, os conídios foram removidos da superfície da cultura, homogeneizados em 20 mL de água destilada esterilizada + 1 gota de Tween 20[®] e filtrado em gaze esterilizada para o preparo da suspensão que foi ajustada para 1×10^6 conídios mL⁻¹.

Para determinar os efeitos da temperatura, salinidade, pH e do potencial osmótico do meio sobre a germinação de conídios de *P. citrinum*, adicionaram-se 100 µL da suspensão de conídios, na concentração descrita, e 100 µL de BD (Batata-Dextrose) em “poços” de microplacas de 96 cavidades esterilizadas, sendo vedadas com filme PVC. Estas placas foram acondicionadas em câmaras de crescimento nas temperaturas de 20, 25, 30, 35 e 40°C para investigar a tolerância dos conídios a essas condições. De modo semelhante, para simular o estresse salino, adicionou-se NaCl ao meio BD, nas concentrações de 0, 2, 4, 6, 8 e 10%.

Para o pH, ajustou-se o meio BD para pH 3, 5, 7, 9 e 11, empregando-se soluções de HCl 1,0 M ou NaOH 1,0 M. Avaliou-se, ainda, a tolerância dos conídios ao estresse hídrico em meio BD por meio de um gradiente de concentração de polietilenoglicol - PEG 6000 (0, 119,6 g; 178,3 g; 223,6 g; 261,9 g; 295,7 g 1000 mL⁻¹) com os respectivos potenciais osmóticos (0, -2, -4, -6, -8, -10 MPa) conforme proposto por Villela et al. (1991). Foi utilizado, também, um tratamento controle com apenas meio BD e a suspensão de conídios. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições. Nos tratamentos

que não envolviam temperatura, as microplacas foram incubadas a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 16 horas. Em seguida, procedeu-se a contagem de 100 conídios por repetição, visualizados aleatoriamente em microscópio óptico (40x). Considerou-se como conídio germinado aquele cujo comprimento do tubo germinativo apresentou-se igual ou superior à metade de seu próprio comprimento.

Os dados obtidos foram submetidos às análises de variância e de regressão polinomial. Utilizou-se o software Sisvar versão 4.0 (FERREIRA, 2000) para a realização das análises.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliou-se a tolerância dos conídios de *P. citrinum* a diversos estresses abióticos em meio de cultivo. Em todas as variáveis analisadas, o melhor ajuste foi dado pelo modelo de regressão quadrático. Analisando-se os resultados de temperatura, observou-se uma redução do percentual da germinação de conídios de *P. citrinum* em função da exposição ao aumento da temperatura (Figura 1A), sendo que a maior germinação ocorreu na temperatura de 26°C . Entretanto, na temperatura de 40°C , a germinação dos conídios foi totalmente inibida (Figura 1A).

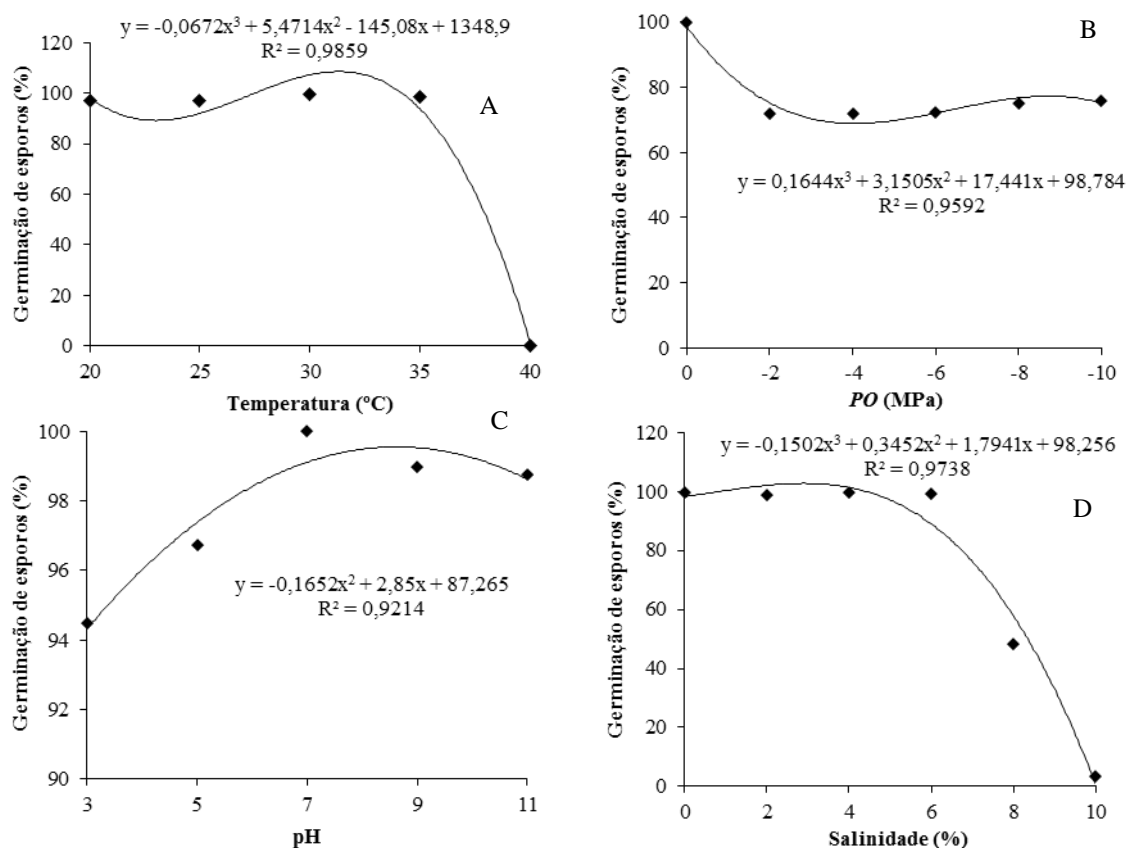


Figura 1. Efeito da temperatura - $^{\circ}\text{C}$ (A), potencial osmótico – PO (B), salinidade - % (C) e pH (D) na germinação de conídios de *Penicillium citrinum*.

Penicillium citrinum apresentou redução média de 27% na germinação de esporos em função da diminuição do potencial osmótico do meio, obtida com a dose mais baixa de PEG 6000 (Figura 1B) e, a partir de -2 MPA, não houve variações na germinação deste ACB (Figura 1B). Por outro lado, a germinação dos conídios não foi afetada pelo pH (Figura 1C). A taxa de germinação variou entre 94 e 100%, com germinação máxima

estimada no pH 8,7. Resultados semelhantes ao encontrado neste trabalho foram obtidos por Sautour et al. (2001) ao observarem que maiores taxas de germinação de esporos de *P. chrysogenum* foram associadas a PO próximo a zero, temperatura na faixa de 25°C e que o pH não teve efeito significativo sobre a germinação de conídios do fungo. Estes resultados podem estar relacionados ao fato de *P. citrinum* ter sido isolado de mudas de sisal oriundas da região semiárida da Bahia, o que garante ao fungo, sobrevivência em ambientes adversos.

Os conídios de *P. citrinum*, submetidos às diversas concentrações de NaCl, apresentaram diminuição no percentual de germinação de esporos. Este isolado obteve germinação próxima a 100% nas concentrações de até 6% de NaCl, seguida de forte redução em concentrações mais elevadas (Figura 1D).

As alternativas de manejo de sistemas biológicos atuais, como na agricultura, podem não ser sustentáveis nas condições de clima que se desenham nos cenários de mudanças climáticas. Conforme mencionado por Cañamás et al. (2008), para que o controle biológico seja eficiente, é necessário que sejam selecionados micro-organismos nativos adaptados às condições edafoclimáticas locais. No entanto, as mudanças esperadas indicam a lentidão no desenvolvimento de novos produtos biológicos e mostram a necessidade de que os estudos considerem as novas características climáticas nas quais se enquadrarão os sistemas produtivos.

Conclusões

Houve forte redução da germinação de conídios de *P. citrinum* com o aumento da temperatura e salinidade, sendo limitantes para a sua germinação as condições de temperatura próximas a 40°C e as concentrações de 8 e 10% de NaCl.

Os conídios de *P. citrinum* não foram afetados pela redução do potencial osmótico do meio de cultivo e os níveis de pH testados.

Referências

ALVARENGA JÚNIOR, E. R. **Cultivo e aproveitamento do sisal**. (*Agave sisalana*): dossiê técnico. Belo Horizonte: CETEC, 2012. 34 p.

CAÑAMÁS, T. P.; VIÑAS, I.; USALL, J.; CASALS, C.; SOLSONA, C.; TEIXIDÓ, N. Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest application of the biocontrol agente *Pantoea agglomerans* CPA-2. Part I. Study of different formulation strategies to improve survival of cells in unfavourable environmental conditions. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 49, p. 86-87, 2008.

COMPANT, S.; HEIJDEN, M. G. A. van der; SESSITSCH, A. Climate change effects in beneficial plant-microorganism interactions. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 73, 197-214, 2010.

COUTINHO, W. M.; LUZ, C. M.; SUASSUNA, N. D.; SILVA O. F. E.; SUINAGA, F. A. **A podridão vermelha do tronco do sisal**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 4 p. (Embrapa Algodão. Comunicado Técnico, 281).

DAMASCENO, C. L. **Potencial de *Penicillium citrinum* para o controle de *Aspergillus niger*, agente causal da podridão vermelha do sisal**. 2012. 69 f. Monografia (Graduação) Cruz das Almas.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000 São Carlos. **Resumos**. São Carlos: UFSCAR, 2000. p. 255-258.

LIMA, E. F.; MOREIRA, J. de A. N.; BATISTA, F. A. S.; SILVA, O. R. R. F. da; FARIAS, F. J. C.; ARAÚJO, A. E. Podridão vermelha do tronco do sisal (*Agave sisalana* Perr.) causada por *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 2, n. 2, p. 109-112, 1998.

MAGALHÃES, V. C. **Uso de bactérias de Restinga no controle da podridão vermelha do sisal**. 2012. 92 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.

SÁ, J. O. **Controle biológico da podridão vermelha do sisal (*Agave sisalana* Perrine) com *Trichoderma* spp. e actinobactérias**. 2013. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.

SAUTOUR, M.; ROUGET, A.; DANTIGNY, P.; DIVIES, C.; BENSOUSSAN, M. Prediction of conidial germination of *Penicillium chrysogenum* as influenced by temperature, water activity and pH. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 32, p.131-134, 2001.

SILVA, A. C. M. **Densidades populacionais, diversidade e atividade de bactérias endofíticas de sisal contra *Aspergillus niger***. 2012. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.

VILLELA, F. A.; DONI FILHO, L.; SEQUEIRA, E. L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, p. 1957-1968, 1991.