

Efeito de meios de cultura e regimes de luz no crescimento micelial, esporulação, dimensão de conídios e peso seco de *Exserohilum turcicum*

Elineide Barbosa da SILVA¹, Viviane Jurema Lopes Borges RODRIGUES¹, Maria MENEZES²

Foi testado o efeito de três meios de cultura (BDA, batata-dextrose-ágar; CDA, cenoura-dextrose-ágar; VDA, vagem-dextrose-ágar) e três regimes de luz (CC, claro contínuo; AL, alternância luminosa; EC, escuro contínuo), no crescimento micelial, esporulação, dimensão de conídios e peso seco de um isolado de *Exserohilum turcicum*. O melhor crescimento micelial, analisado aos sete dias de incubação, foi constatado no meio VDA e no regime de luz claro contínuo, enquanto que maior esporulação foi verificada no meio BDA e em regime de luz escuro contínuo. Em ambos os parâmetros houve influência significativa dos meios de cultura e dos regimes de luz. O comprimento e a largura dos conídios foram pouco influenciados pela interação meio de cultura e regime de luz. O maior peso seco do fungo foi obtido no meio VD sob regime de claro contínuo. As condições que proporcionaram maior crescimento micelial também induziram ao maior peso seco.

Palavra-chave: *Exserohilum turcicum*, meios de cultura, regimes de luz, fungo, milho, crescimento micelial, Fitossanidade.

INTRODUÇÃO

A queima das folhas do milho, doença causada por *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard e Suggs. (Sin. *Helminthosporium turcicum* Pass.), é encontrada em quase todas as áreas produtoras do país (Heidrich-Sobrinho e Hermes, 1981). A época de aparecimento da doença, bem como a severidade do ataque, são determinadas sobretudo pelas condições do ambiente. Chenolu e Hora (1962) e Hughes e Hooker (1971), relataram que as perdas causadas por este patógeno na produção de grãos podem variar de 27 a 90%.

Geralmente, a condição nutricional ótima para crescimento vegetativo de um fungo não é necessariamente a melhor para a produção de esporos. Além disso, condições ambientais favoráveis para a produção do micélio podem ser inadequadas para a esporulação, como é o caso da luminosidade. Diferentes fungos variam consideravelmente em sua resposta à luz. Muitos fungos imperfeitos esporulam bem quando iluminados, mas na escuridão total não produzem esporos ou o fazem pobremente (Leach, 1967). Para outros, foi demonstrado que além do requerimento de luz para o estímulo à esporulação, é necessário um período subsequente de escuro para realização do processo (Aragaki, 1961; Lukens, 1963).

Um outro fator que influencia a esporulação dos fungos é a concentração de nutrientes. A concentração mínima de nutrientes que permite o crescimento micelial é raramente ou nunca suficiente para a produção de esporos. Sabe-se que certos meios naturais são mais favoráveis à esporulação, em relação aos meios sintéticos padronizados. Estes meios naturais geralmente contêm carboidratos complexos, cujo efeito pode ser favorável à esporulação. Meios sintéticos contêm glucose como fonte de carbono e este açúcar, sendo prontamente assimilado pela maior parte dos fungos, induz a um vigoroso crescimento micelial. Carboidratos mais complexos são frequentemente menos adequados para a produção de hifas vegetativas, porém podem ser mais adequados para a produção de esporos (Lukens, 1963).

Com relação a *E. turcicum* poucos trabalhos foram realizados neste sentido, destacando-se dentre estes, o de Malca e Ullstrup (1962), que relataram o meio contendo caseína hidrolizada como bom substrato para o cultivo deste patógeno.

Em vista da escassa bibliografia sobre meios de cultura e regimes de luz que proporcionem melhor crescimento micelial e esporulação de *E. turcicum*, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de fornecer informações básicas para futuros trabalhos que

¹ Bolsista de DTI do CNPq/FACEPE/IPA

² Prof. Adjunto do Depto. de Agronomia da UFRPE

envolvam determinação de crescimento micelial ou esporulação e obtenção de grandes quantidades de conídios desse patógeno.

MATERIAL E MÉTODOS

O isolado do fungo *E. turcicum* foi proveniente da Micoteca do Laboratório de Micologia - Área de Fitossanidade do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Meios de cultura e regimes de luz

Foram utilizados os meios de cultura sólidos: Batata-Dextrose-Ágar (BDA- 200g de batata; 20g de dextrose; 17g de ágar; 1000ml de água destilada); Cenoura-Dextrose-Ágar (CDA- 200g de cenoura; 20g de dextrose; 17g de ágar; 1000ml de água destilada) e Vagem-Dextrose-Ágar (VDA- 200g de vagem; 20g de dextrose; 17g de ágar; 1000ml de água destilada esterilizada) e os meios líquidos Batata-Dextrose (BD); Cenoura-Dextrose (CD) e Vagem-Dextrose (VD).

Os regimes de luz utilizados foram: claro contínuo (CC), escuro contínuo (EC) e alternância luminosa (AL) (fotoperíodo de 12h de claro e 12h de escuro). Como fonte de luz foi utilizada uma lâmpada fluorescente (40 Watts), colocada 30cm acima das placas. Escuro contínuo foi obtido colocando-se as placas em local isento de luz.

Efeito dos substratos e luminosidade no crescimento micelial, esporulação e dimensão de conídios

Discos de meio de cultura BDA com micélio de *E. turcicum*, medindo 5 mm de diâmetro, foram colocados no centro de placas de Petri contendo os diferentes meios de cultura (BDA, CDA e VDA). Após este procedimento, três placas de cada tratamento foram mantidas sob os diferentes regimes de luz, a uma temperatura em torno de 27°C.

A avaliação do crescimento micelial foi efetuada diariamente através de medições do diâmetro das colônias em dois sentidos diametralmente opostos, até um dos tratamentos alcançar o diâmetro completo da placa (90mm).

A esporulação foi determinada com o auxílio de uma câmara de Neubauer, após sete dias de incubação. Para esta determinação, foram utilizadas suspensões de esporos preparadas a partir da remoção da superfície da colônia, com auxílio de uma escova de

cerdas macias, e adição de 20ml de água destilada e esterilizada contendo Tween 80 (1:100) por placa, fazendo-se a filtração através de camada dupla de gaze.

Foi verificada na mesma suspensão utilizada para determinar a esporulação, a dimensão dos conídios. Gotas de hipoclorito de sódio (3:100) foram adicionadas às suspensões, visando inibir a germinação dos esporos e, através de uma lente micrométrica, procedeu-se a medição dos conídios tomando-se ao acaso 20 unidades por lâmina, para cada repetição.

Efeito dos substratos e luminosidade no peso seco

Discos de meio de cultura BDA com micélio de *E. turcicum*, medindo 5mm de diâmetro, foram colocados em 100ml dos meios líquidos (BD, CD e VD) contidos em Erlenmeyers de 250ml. Os Erlenmeyers foram incubados à temperatura de 27°C nos três regimes de luz já referidos, durante o período de sete dias. Diariamente foram agitados duas vezes, para renovação do ar.

Para determinação do peso seco, o meio contendo o crescimento fúngico foi filtrado em tecido de nylon, e a massa retida na malha, colocada em recipiente de alumínio previamente tarado. O material foi mantido em estufa a 80°C, durante 21h, após o qual procedeu-se a pesagem.

Em todos os experimentos utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3 x 3 (meios de cultura x regimes de luz), com três repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os meios de cultura e os regimes de luz influenciaram significativamente o crescimento micelial e a esporulação de *E. turcicum* (Tabela 1). O maior crescimento micelial foi obtido na interação CDA e claro contínuo (CC), apesar de não diferir significativamente da interação VDA e mesmo regime de luz. Na média geral, considerando-se o efeito dos meios, independente da luminosidade, o melhor substrato para crescimento micelial foi o VDA. Em geral, no meio BDA o crescimento foi retardado, tanto no efeito isolado do substrato, como também na interação com regimes de luminosidade, indicando que este fungo exige condição específica que proporcione um melhor desempenho do crescimento micelial. Malca e Ullstrup (1962) relataram que o melhor meio

para crescimento e esporulação de *E. turcicum* e *Bipolaris zeicola* (G.L. Stout) Shoemaker (Sin. *H. carbonum* Ullstrup) é o meio contendo lactose e caseína hidrolizada.

TABELA 1- Efeito de diferentes meios de cultura e regimes de luz no crescimento micelial de *Exserohilum turcicum*, após sete dias de incubação

Meio de cultura ¹	Crescimento Micelial (mm) ³			Média ⁴
	CC ²	AL	EC	
VDA	84,83 aA	67,67 aA	31,00 aB	61,17 a
CDA	85,00 aA	43,00 bB	31,67 aB	53,22 a
BDA	33,00 bA	36,00 bA	42,33 aA	37,11 b
Média	67,61 A	48,89 B	35,00 C	

¹ Meios de cultura: BDA = Batata-Dextrose-Agar; CDA = Cenoura-Dextrose-Ágar; VDA = Vagem-Dextrose-Ágar

² Regimes de luz: CC = Claro contínuo; AL = Alternância luminosa; EC = Escuro contínuo

³ Média de três repetições

⁴ Média de quatro repetições

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

As diferenças detectadas no crescimento micelial de *E. turcicum* nos vários regimes de luz evidenciaram a influência determinante da luz neste parâmetro. Por outro lado, considerando-se o efeito da luminosidade, independente do substrato, verifica-se que o claro contínuo induziu maior crescimento do fungo em relação aos demais regimes de luz. Cochrane (1958) relata que a luz exerce efeito direto sobre a célula fúngica e não sobre o meio de cultivo, estimulando ou inibindo o crescimento ou esporulação. Minussi et al. (1977), trabalhando com *Stemphyllium solani*, observaram que a luz, através de sua qualidade e intensidade, afeta a taxa de crescimento e indução de formação de estruturas reprodutivas, verificando a necessidade de luz contínua para um melhor crescimento micelial, obtendo-se no escuro contínuo um crescimento inferior.

A produção de conídios em escuro contínuo (EC) foi significativamente maior que em AL e CC nos meios BDA e CDA (Tabela 2). O meio BDA, considerado isoladamente, induziu a maior produção de conídios, atingindo uma esporulação média de $2,97 \times 10^6$ conídios/ml. A melhor esporulação foi obtida no escuro contínuo, sendo este resultado inverso ao obtido para o crescimento micelial. Os

resultados estão em concordância com Lilly e Barnett (1951), quando dizem que as condições nutricionais sob as quais os fungos esporulam, em muitos casos, são completamente diferentes daquelas ótimas para o crescimento vegetativo e vice-versa. Coelho (1980) indicou para melhor esporulação de *E. turcicum* a manutenção dos isolados em estufa à temperatura de 26°C na ausência de luz. Massola e Bedendo (1993) também observaram que a condição de escuro contínuo foi a mais favorável à esporulação de *B. oryzae* (Brede de Haan) Shoemaker (Sin. *H. oryzae* Shoemaker).

TABELA 2- Efeito de diferentes meios de cultura e regimes de luz na esporulação de *Exserohilum turcicum*, após sete dias de incubação

Meio de cultura ¹	Esporulação ³ (1×10^6 con./ml)			Média ⁴
	EC ²	CC	AL	
BDA	4,37 aA	1,56 aB	2,99 aAB	2,97 a
CDA	4,31 aA	1,43 aB	2,04 abB	2,59 a
VDA	2,31 bA	1,30 aA	1,24 bA	1,62 b
Média	3,66 A	2,09 B	1,43 B	

¹ Meios de cultura: BDA = Batata-Dextrose-Ágar; CDA = Cenoura-Dextrose-Agar; VDA = Vagem-Dextrose-Ágar

² Regimes de luz: CC = Claro contínuo; AL = Alternância luminosa; EC = Escuro contínuo

³ Média de três repetições

⁴ Média de quatro repetições

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Médias transformadas $(X + 1)^{1/2}$

Segundo Aragaki (1962) não é o escuro que estimula a esporulação, mas sim a ausência de certos comprimentos de onda na região do azul e do violeta que têm efeito inibitório nesse processo fisiológico.

Também foi observada uma diferença entre o meio de cultura que favoreceu o melhor crescimento micelial (VDA) e esporulação (BDA), discordando de Barnett (1985), o qual afirmou que em geral, a produção de estrutura de frutificação e esporulação ocorre no mesmo meio do crescimento micelial, demonstrando neste caso, haver poucas evidências sobre a necessidade de um nutriente específico que provoque a esporulação. Conforme verificado nos dados obtidos no presente trabalho, pode-se dizer que o substrato indutor do maior crescimento micelial não foi o mesmo para

indução da melhor esporulação. Cochrane (1958) e Lilly e Barnette (1951) já comentaram amplamente sobre este fato, e isto parece depender das exigências particulares de cada organismo na realização dos dois processos fisiológicos.

Quanto a dimensão dos conídios (Tabela 3 e 4), o maior comprimento foi obtido na interação BDA/CC (98,72 μm) diferindo significativamente de CDA/CC e VDA/CC. As interações dos substratos com AL ou EC, de um modo geral não mostraram diferença significativa, embora em BDA/AL e CDA/EC o fungo não tenha apresentado o mesmo comprimento dos conídios produzidos (92 e 84 μm) em média. A largura não diferiu significativamente nos meios, tendo em BDA/EC a maior largura (19,70 μm). O regime de luz não influenciou significativamente na largura dos conídios, porém no escuro contínuo apresentou aumento médio de 15,9 e 18,48% em relação ao claro contínuo e alternância luminosa, respectivamente, no meio BDA. A faixa de variação na dimensão dos conídios, comprimento de 69,00 a 98,72 μm e largura de 15,08 a 19,70 μm , está de acordo com os dados obtidos por Luttrell (1958), o qual verificou que conídios de *E. turcicum* apresentam comprimento variando de 45 a 132 μm e largura de 15 a 25 μm .

TABELA 3- Efeito de diferentes meios de cultura e regimes de luz no comprimento de esporos de *Exserohilum turcicum*, após sete dias de incubação

Meio de cultura ¹	Comprimento (μm) ³			Média ⁴
	CC ²	AL	EC	
BDA	98,72 aA	92,46 aA	69,00 aB	86,73 a
CDA	75,82 bA	78,78 abA	84,34 aA	79,65 a
VDA	72,82 bA	73,64 bA	75,08 aA	73,85 a
Média	82,45 A	81,63 A	76,14 A	

¹ Meios de cultura: BDA = Batata-Dextrose-Ágar; CDA = Cenoura-Dextrose-Ágar; VDA = Vagem-Dextrose-Ágar

² Regimes de luz: CC = Claro contínuo; AL = Alternância luminosa; EC = Escuro contínuo

³ Média de três repetições

⁴ Média de quatro repetições

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

TABELA 4- Efeito de diferentes meios de cultura e regimes de luz na largura de esporos de *Exserohilum turcicum*, após sete dias de incubação

Meio de cultura ¹	Largura (μm) ³			Média ⁴
	EC ²	CC	AL	
BDA	19,70 aA	16,56 aA	16,06 aA	17,44 a
CDA	18,32 aA	15,54 aA	15,08 aA	16,72 a
VDA	17,08 aA	17,40 aA	16,30 aA	16,52 a
Média	18,37 A	16,50 B	15,81 B	

¹ Meios de cultura: BDA = Batata-Dextrose-Ágar; CDA = Cenoura-Dextrose-Ágar; VDA = Vagem-Dextrose-Ágar

² Regimes de luz: CC = Claro contínuo; AL = Alternância luminosa; EC = Escuro contínuo

³ Média de três repetições

⁴ Média de quatro repetições

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

Segundo Cochrane (1958), o peso seco é a maneira mais utilizada para avaliar o crescimento de fungos, porém a sua limitação é que este pode refletir na acumulação de polissacarídeos, ou materiais de reserva, ao invés da síntese de novo protoplasma. O maior peso seco de *E. turcicum* no presente estudo foi verificado no meio VD em claro contínuo (Tabela 5), com peso seco superior em 16,7% em relação ao meio CD e 33,3% ao meio BD. Tal resultado evidenciou que as condições que proporcionaram maior crescimento micelial também induziram a obtenção de maior peso seco. Este parâmetro também foi influenciado significativamente pelo meio de cultura e regime de luz.

TABELA 5- Efeito de diferentes meios de cultura e regimes de luz no peso seco de *Exserohilum turcicum*, após sete dias de incubação

Meio de cultura ¹	Peso seco (mg) ³			Média ⁴
	CC ²	AL	EC	
VD	0,30 aA	0,29 aAB	0,25 aB	0,28 a
CD	0,25 bA	0,18 bB	0,18 bB	0,20 b
BD	0,20 cA	0,10 cB	0,11 cB	0,14 c
Média	0,25 A	0,19 B	0,18 B	

¹ Meios de cultura: BD = Batata-Dextrose; CD = Cenoura-Dextrose; VD = Vagem-Dextrose

² Regimes de luz: CC = Claro contínuo; AL = Alternância luminosa; EC = Escuro contínuo

³ Média de três repetições

⁴ Média de quatro repetições

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

Em resumo, os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões: a) VDA, em condições de claro contínuo, exerceu um efeito altamente positivo no crescimento micelial de *E. turcicum*; b) BDA, em escuro contínuo, foi favorável a maior produção de conídios ($4,37 \times 10^6$ con./ml); c) VD, em claro contínuo, favoreceu a obtenção de maior peso seco do micélio; d) BDA, em claro contínuo, induziu maior comprimento dos conídios, enquanto que em escuro contínuo, maior largura, porém dentro da variação normal indicada para a espécie estudada.

Portanto, o conhecimento das condições favoráveis ao bom desempenho vegetativo e reprodutivo de *E. turcicum*, torna-se de grande importância para a realização de estudos envolvendo os postulados de Koch, identificação de cultivares resistentes ao patógeno, nutrição, taxonomia com base morfológica e genética, além de outras aplicações.

ABSTRACT

The effect of three culture media (PDA, potato-dextrose-agar; CDA, carrot-dextrose-agar; VDA, pod-dextrose-agar) and three light regimes (CL, continuous light; AL, alternative light; CD, continuous dark) on the mycelial growth, sporulation, conidia dimension and dry weigh of a colony of *Exserohilum turcicum*. A superior mycelial growth, analysed at the 7th day of incubation, was obtained with the VDA medium and the continuous light, while a superior sporulation was obtained on the PDA medium under continuous dark. In both parameters a significative difference of medium type and light regime was observed. A little effect of culture media and light regime on size of conidia was observed for interaction of PDA/continuous light on length, and PDA/continuous dark on width. The highest dry weigh was obtained with the VD medium under continuous light regime. The conditions which induced the greatest mycelial growth also induced the best dry weigh.

Key words: *Exserohilum turcicum*, culture media, light regimes, fungus, maize.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ARAGAKI, M. Radiation and temperature interaction on the sporulation of *Alternaria tomato*. *Phytopathology*, Baltimore, v.51, n.11, p.803-805, 1961.
- 2 ARAGAKI, M. Quality of radiation inhibitory to sporulation of *Alternaria tomato*. *Phytopathology*, Baltimore, v. 52, n. 11, p. 1227-1228, 1962.
- 3 BARNETT, H. L. *Fungus physiology research at the west Virginia agricultural and forestry experiment station, 1922-1982*. Morgantown : West Virginia University, 1985. 113 p.
- 4 CHENOLU, V. V.; HORA, T. S. Studies of losses to *Helminthosporium turcicum* blight of maize. *Indian Phytopathology*, New Delhi, v. 15, p. 235-237, 1962.
- 5 COCHRANE, V. W. *Physiology of fungi*. New York : John Wiley, 1958. 438 p.
- 6 COELHO, R. S. B. *Patogenicidade de Helminthosporium turcicum* Pass. e herança de resistência de diferentes fontes de milho. Piracicaba, 1980. 62 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, 1980.
- 7 HEIDRICH-SOBRINHO, E.; HERMES, M. T. L. Studies of genetic resistance to and virulence of *Trichometasphaerica turcica* Lutt. in corn. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, v. 4, p. 17-28, 1981.
- 8 HUGHES, G. R.; HOOKER, A. L. Gene action conditioning resistance to northern leaf blight in maize. *Crop Science*, Madison, v. 11, p. 180-184, 1971.
- 9 LEACH, C. M. Interaction of near ultraviolet light and temperature on sporulation of the fungi *Alternaria*, *Cercospora*, *Fusarium* *Helminthosporium* and *Stemphylium*. *Canadian Journal Botany*, Ottawa, v. 45, p. 1999-2016, 1967.
- 10 LILLY, V. G.; BARNETT, H. C. *Physiology of the fungi*. New York : McGraw Hill, 1951. 464 p.
- 11 LUKENS, R. J. Photo-inhibition os sporulation in *Alternaria solani*. *American Journal Botany*, New York, v. 50, p. 720-724, 1963.
- 12 LUTTRELL, E. S. The perfect stage of *Helminthosporium turcicum*. *Phytopathology*, Baltimore, v. 48, n. 5, p. 281-287, 1958.
- 13 MALCA, I.; ULLSTRUP, A. J. Effects of carbon and nitrogen nutrition on growth and sporulation of two species of *Helminthosporium*. *Bulletim Torrey Botanical Club*, Lancaster, n. 89, p. 240-249, 1962.
- 14 MASSOLA, N. S.; BEDENDO, I. P. Produção de conídios por *Helminthosporium oryzae* : influência

da composição do meio de cultura, período de incubação, regime de luz e temperatura. *Summa Phytopathologica*, Jaguariúna, v. 19, n. 3-4, p. 157-161, 1993.

15

MINUSSI, E.; MACHADO, C. C.; MENTEN, J. O. M. et al. Efeitos de diferentes regimes de luz na esporulação de *Stemphylium solani* Weber em meio de cultura. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 2, n. 2, p. 167-171, 1977.