

## Efeito de meios de cultura e fontes de carbono e nitrogênio sobre *Bipolaris sacchari*, em capim elefante

Ana Mércia Mendes SILVA<sup>1</sup>; Sônia Maria Alves de OLIVEIRA<sup>1</sup>; Ailton REIS<sup>2</sup>; Suzana Alencar Freire DANTAS<sup>1</sup>

**RESUMO:** No presente trabalho foram estudadas as características patogênicas e fisiológicas de um isolado do fungo *Bipolaris sacchari*, agente da mancha ocular do capim elefante. Na caracterização fisiológica, estudou-se o comportamento do fitopatógeno em cinco meios de cultura (BDA-batata-dextrose-ágar; CDA-ura-dextrose-ágar; SDA-farinha de soja-dextrose-ágar; LCH-lactose-caseína hidrolizada; V8-suco de vegetais-dextrose-ágar), em combinação com dois períodos de incubação (sete e 14 dias), duas fontes de carbono (dextrose e frutose) e três de nitrogênio (peptona, nitrato de potássio e sulfato de amônio) sob ausência de luz (escuro contínuo). Em todos os experimentos, a temperatura média foi de 25±2°C. Os meios de cultura SDA e LCH e nas combinações de carbono e nitrogênio onde a peptona estava presente, constituíram-se nas melhores condições para o crescimento micelial de *B. sacchari* aos sete e 14 dias de incubação. Elevada produção de conídios foi obtida quando da utilização do meio CDA (54,27x10<sup>3</sup> conídios/mL) aos 14 dias de incubação, bem como na combinação frutose x peptona, aos sete dias de incubação (55,05x10<sup>3</sup> conídios/mL).

Palavras chave: *Bipolaris sacchari*, *Pennisetum purpureum*, fisiologia

### INTRODUÇÃO

O capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) é nativo da África (Jacques, 1994) onde ocorre naturalmente em vários países, desde o oeste da Guiné até Angola e Rodésia (atual Zimbábue) no Sul, Moçambique e Kênia, no leste africano (Brunken, 1977). A espécie foi descoberta em 1905 por Schinz, na Rodésia, África Tropical, que mencionou pela primeira vez seu valor como gramínea forrageira (Araújo, 1972). Esse aspecto se tornou mais proeminente a partir de 1908, quando Napier recomendou a sua utilização como alimento forrageiro (Gonçalves & Menezes, 1982). O capim elefante foi introduzido no Brasil em 1920, pelo então Instituto de Biologia Animal do Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro (Castilho, 1987). Atualmente, este encontra-se difundido em todas as regiões do território nacional, adaptando-se aos mais diversos ambientes agroecológicos (Santos, 1996). Apesar de ser uma gramínea bastante rústica, apresentando alta resistência a pragas e doenças, no Estado de Pernambuco, em 1995, foram observadas plantas de capim elefante apresentando uma queima foliar até então desconhecida. Os isolamentos e identificação foram realizados no Laboratório de Micologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e constatou-se a presença do fungo *Bipolaris sacchari* (E.J. Butler) Schoemaker (Sin.: *Helminthosporium sacchari* E.J. Butler in E.J. Butler & Hafiz Khan), considerado por Melo Filho *et al.* (1996) agente etiológico da mancha ocular. Esta doença é muito importante sobre cana-de-açúcar, principalmente em canaviais suscetíveis nos Estados de Santa Catarina, Paraná e algumas vezes em municípios de São Paulo. Quando ocorre epifitias seus efeitos são drásticos, podendo dizimar áreas extensas da cultura onde se verifica acúmulo de ar frio e neblina (Tokeshi, 1997). A mancha ocular é uma doença das mais

severas sobre o milheto, principalmente após o pendoamento das plantas, chegando inclusive a uma queima severa de folhas na época em que as plantas estão maduras, causando com isso perdas acentuadas na produção (Luttrell, 1954).

O efeito da temperatura sobre *B. sacchari* em diferentes meios, indicam que o patógeno cresce bem numa faixa de 16° a 28°C (Parris, 1941). Halma & Fawcett (1925) observaram que em temperaturas entre 20° e 29°C, o fitopatógeno apresentou um bom crescimento. Segundo Parris (1941), foi obtido um crescimento menor em temperaturas mais baixas do que em temperaturas elevadas. Os conídios de *B. sacchari* são compridos, estreitos e possuem mais septos quando formados a 28°C, do que quando produzidos a 21°C. O crescimento micelial em diversos meios e temperaturas, apresentou diferença marcante na variabilidade das formas de crescimento, podendo apresentar-se com micélio espesso, aéreo, luxuriante e irregular com expansão radial. A cor também variou de acordo com o substrato, temperatura e regime de luminosidade estudados (Parris, 1941).

Pesquisando o efeito de três meios de cultura (BDA, folha de cana-de-açúcar, lactose-caseína hidrolizada) e diferentes regimes de luz, na esporulação de *B. sacchari*, Lopes & Bergamin Filho (1993) verificaram que independente do meio de cultura, escuro contínuo inibiu o crescimento, enquanto que a luz contínua ou alternada induziram a produção de esporos. Sob luz contínua, o melhor meio de cultura foi o lactose-caseína hidrolizada e em alternância luminosa os meios não diferiram entre si, entretanto no meio BDA, observaram maior esporulação sob luz alternada.

Diante da importância desta doença para o capim elefante, o objetivo deste trabalho foi estudar características patogênicas e fisiológicas de um isolado de *B. sacchari* em diferentes

<sup>1</sup>UFRPE/DEPA-Fitossanidade. 52171-900-Recife-PE;

<sup>2</sup>EMBRAPA-CNPq, Brasília-DF.

meios de cultura, bem como a influência de fontes de carbono e nitrogênio no crescimento micelial e esporulação do fitopatógeno.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Obtenção do isolado** - O isolado foi obtido a partir de plantas de capim elefante cv. Elefante-B (Mineirão), apresentando lesões típicas da doença, oriundo do município de Itambé-Pernambuco. Para isso, fragmentos de 1 a 2cm foram retirados das lesões e colocados em álcool a 70%, em seguida, feita a desinfestação com hipoclorito de sódio a 1,5%. A seguir, os fragmentos foram lavados duas vezes em água destilada esterilizada (ADE) e transferindo, com ajuda de um estilete flambado, para placas de Petri contendo papel de filtro previamente umedecido com ADE, permanecendo em câmara úmida por cinco dias a uma temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Após este período, com ajuda do microscópio estereoscópio, realizou-se a transferência das estruturas do fungo, com auxílio de um estilete flambado, para placas de Petri contendo o meio lactose-caseína hidrolizada. As placas foram incubadas por sete dias, em condições normais de laboratório.

**Teste de patogenicidade** - O teste de patogenicidade foi realizado em casa de vegetação com plantas de capim elefante cv. Elefante B (Mineirão), com duas semanas de crescimento. Utilizando-se duas plantas por vaso, num total de cinco vasos, incluindo duas plantas como testemunha. A partir de colônias puras de *B. sacchari*, procedeu-se o preparo da suspensão de conídios, adicionando-se 20mL de ADE em cada placa e raspando-se a superfície da colônia com auxílio de uma escova de cerdas macias, em seguida, a suspensão foi filtrada em camada dupla de gaze esterilizada, acrescentando-se Tween 80 a 0,05%. A contagem dos esporos foi realizada através da câmara de Neubauer, ajustando-se a concentração para  $10^4$  conídios/mL. A inoculação foi feita pela atomização da parte aérea das plantas, sendo as testemunhas pulverizadas com ADE. Em seguida, as plantas foram submetidas a uma câmara úmida realizada com auxílio de sacos plásticos umedecidos, durante 36 horas. Após 14 dias procedeu-se a avaliação dos sintomas exibidos pelas plantas.

**Influência de meios de cultura sobre o crescimento micelial e esporulação de *Bipolaris sacchari*** - Discos de 7mm de diâmetro do fitopatógeno, foram depositados no centro de placas de Petri contendo os seguintes meios de cultura: BDA (batata+dextrose+ágar), SDA (farinha de soja+dextrose+ágar), CDA (cenoura+dextrose+ágar), LCH (lactose + caseína

hidrolizada-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-MgSO<sub>4</sub>+ ágar), e V8 (oito sucos de vegetais concentrados - sal - ácido ascórbico - ácido cítrico - ágar). Em seguida, as placas foram incubadas em regime de escuro contínuo, mantidas durante sete e 14 dias a uma temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ . A avaliação do crescimento micelial consistiu na medição diária do diâmetro da colônia em sentidos opostos, utilizando-se uma régua milimetrada. No parâmetro esporulação aos sete e 14 dias de incubação, utilizou-se a câmara de Neubauer. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado com arranjo fatorial 5x2 (cinco meios de cultura x dois períodos de incubação), com quatro repetições por tratamento. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P>0,05$ ).

**Influência de fontes de carbono e nitrogênio sobre o crescimento micelial e esporulação de *Bipolaris sacchari*** - Neste experimento utilizou-se como referência o meio basal de Lilly & Barnett (1951). As fontes de carbono foram dextrose e frutose, enquanto que para nitrogênio utilizou-se peptona (PEP), sulfato de amônio (SA) e nitrato de potássio (NK), combinando-as entre si na proporção de 10C:1N. A incubação, avaliação do crescimento micelial e esporulação de *B. sacchari*, foram realizadas conforme descritas no item acima. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2x3 (duas fontes de carbono x três de nitrogênio), perfazendo um total de seis tratamentos, com quatro repetições por tratamento. As médias foram submetidas ao teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Teste de patogenicidade** - Aos 14 dias de incubação, as plantas de capim elefante cv. Elefante-B (Mineirão), quando inoculadas, exibiram sintomas típicos da doença, caracterizado pelo aparecimento de pequenas manchas elipsóides, marrons, sendo que algumas apresentaram o centro mais claro, confirmando assim alta suscetibilidade ao *B. sacchari*, sintomas estes semelhantes aos descritos por Parris (1941).

**Influência de meios de cultura sobre o crescimento micelial e esporulação de *Bipolaris sacchari*** - Com relação ao crescimento micelial, observa-se que as médias apresentadas na Figura 1, mostram diferenças significativas com relação aos meios de cultura utilizados. Os meios SDA e LCH revelaram melhor crescimento do fitopatógeno, não diferindo estatisticamente entre si com relação aos períodos de incubação (sete e 14 dias), não sendo o mesmo fenômeno observado para os meios V8, CDA e BDA. Segundo Lilly & Barnett

(1951), muitos fungos utilizam melhor os meios naturais e semi-sintéticos para o seu desenvolvimento, os quais fornecem determinadas substâncias que funcionam como estimuladores de crescimento, tornando-se mais eficiente do que os sintéticos. No presente trabalho, o fitopatôgeno utilizou de maneira eficiente um meio semi-sintético (SDA) e um sintético (LCH) de modo semelhante. Por outro lado, os meios CDA e BDA, semi-sintéticos, induziram respostas inferiores aos demais. Lopes & Bergamin Filho (1993), utilizando três meios de cultura e três regimes de luz, observou que o escuro contínuo inibiu o crescimento de *B. sacchari*, o que pode ter explicar o comportamento dos meios testados V8, CDA e BDA, onde utilizou-se o escuro contínuo durante a incubação.

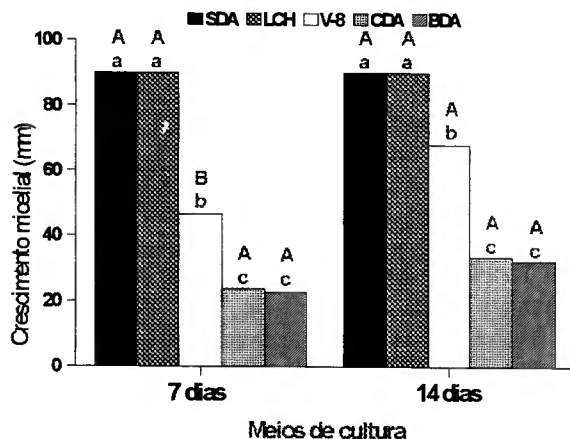


Figura 1 - Crescimento de *Bipolaris sacchari* em diferentes meios de cultura e períodos de incubação. Colunas seguidas da mesma letra, minúsculas dentro da categoria e maiúscula entre categorias, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0.05$ ). SDA (farinha de soja-dextrose-ágar); LCH (lactose-caseína hidrolizada-ágar); V8 (suco de oito vegetais-ágar); CDA (cenoura-dextrose-ágar); BDA (batata-dextrose-ágar).

Quanto a esporulação, os resultados apresentados na Figura 2, revelaram que dentre os meios testados, CDA, V8 e BDA induziram maior produção de conídios, destacando-se, numericamente o CDA nos dois períodos de incubação utilizados, 51,25 e 59,27x 10<sup>3</sup> conídios/mL, respectivamente para sete e 14 dias, quando comparado aos demais. Os meios SDA e LCH, os quais exibiram maiores crescimentos miceliais, foram os que apresentaram resultados insignificantes em relação a esporulação, principalmente o SDA onde a produção de conídios foi nula aos sete dias e muito baixa aos 14 dias de incubação. Talvez estes meios não tenham na sua composição, substâncias que estimulasse a produção de conídios. Estes resultados, no entanto, divergem dos obtidos por Lopes & Bergamin Filho (1993), quando obtiveram

excelente resultado com o meio LCH sob luz contínua, e com o BDA em alternância luminosa, o mesmo acontecendo no trabalho de Amorim *et al.* (1991), Athayde Sobrinho (1994), Cardoso (1995) e Lima (1996), com os fungos *Fusarium decemcellulare*, *Plenodomus destruens*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Botryodiplodia theobromae*, respectivamente. Isto demonstra que o substrato BDA, preenche mais as exigências nutricionais dos fungos, no que diz respeito a esporulação.

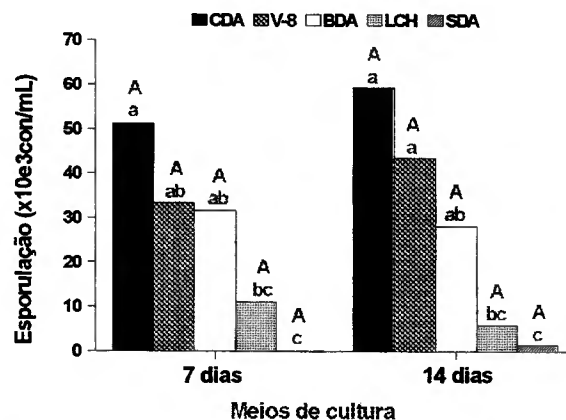


Figura 2 - Esporulação de *Bipolaris sacchari* em diferentes meios de cultura e períodos de incubação. Colunas seguidas da mesma letra, minúsculas dentro da categoria e maiúscula entre categorias, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0.05$ ). Dados transformados em  $\sqrt{x + 5}$ . SDA (farinha de soja-dextrose-ágar); LCH (lactose-caseína hidrolizada-ágar); V8 (suco de oito vegetais-ágar); CDA (cenoura-dextrose-ágar); BDA (batata-dextrose-ágar).

**Influência de fontes de carbono e nitrogênio sobre o crescimento micelial e esporulação de *Bipolaris sacchari*** - No que concerne a influência de diferentes combinações de fontes de carbono e nitrogênio, quando a peptona estava presente, ocorreu melhores resultados em relação ao crescimento micelial de *B. sacchari* independente do período de incubação (Figura 3). Resultados semelhantes foram obtidos por Cardoso (1995) e Lima (1996), o mesmo sendo observado para esporulação do referido fitopatôgeno. Segundo Cochrane (1958), uma melhor resposta induzida pela peptona era esperado, uma vez que a disponibilidade do nitrogênio nas fontes orgânicas é bem maior que nas inorgânicas. Por outro lado, as combinações de carbono e nitrogênio, onde o nitrato de potássio e sulfato de amônio estava presente, ocorreu um crescimento micelial razoável. Estes resultados diferem daqueles encontrados nos trabalhos de Tandon & Chandra (1962) e Kurtz & Fergus (1964), que obtiveram melhores respostas para o crescimento de *C. gloeosporioides* e *C. coccodes*, respectivamente, com sulfato de amônio e nitrato de potássio.

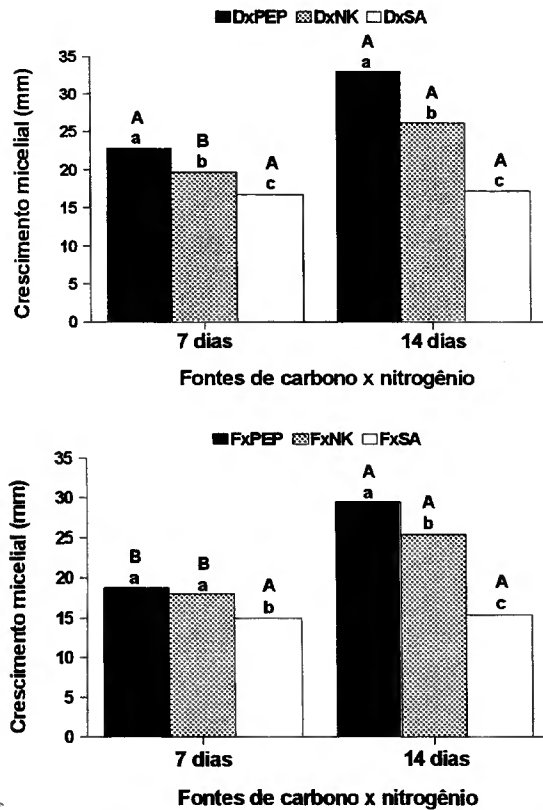


Figura 3 - Crescimento de *Bipolaris sacchari* em diferentes combinações de fontes de carbono e nitrogênio e períodos de incubação. Colunas seguidas da mesma letra, minúsculas dentro da categoria e maiúscula entre categorias, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0.05$ ). DxP (dextrose-peptona); DxNK (dextrose-nitrato de potássio); DxSA (dextrose-sulfato de amônio); FxP (frutose-peptona); FxNK (frutose-nitrato de potássio); FxSA (frutose-sulfato de amônio).

A produção de conídios do fitopatógeno nas diferentes combinações de C e N, observa-se na Figura 4 que as combinações onde estava presente a peptona como fonte de N, proporcionou maior esporulação, independente do período de incubação (sete e 14 dias), sendo frutose x peptona a que ofereceu maior número de conídios aos sete dias ( $55,05 \times 10^3$  con./mL). As combinações que apresentaram resultados insatisfatórios, foram aquelas onde estava presente o sulfato de amônio, independente da fonte de C utilizada nos dois períodos de tempo testados.

As fontes de nitrogênio, sulfato de amônio e nitrato de potássio, apresentaram resultados bastante insatisfatórios em relação ao crescimento micelial e esporulação de *B. sacchari* em todas as combinações e períodos de incubação utilizados, em relação as demais fontes de C e N. Resultados semelhantes obteve Athayde Sobrinho (1994), quando trabalhando com *P. destruens* observou as menores taxas e valores totais de crescimento, quando o nitrogênio usado apresentava-se na forma de

sulfato de amônio. Este fato, pode ser explicado através da estreita relação entre a utilização de nitrogênio amoniacal e as alterações de pH induzidas. Assim, Cochrane (1958) relata que a bio utilização de sais de amônio é dependente do pH, e que a medida que este composto é metabolizado, induz de forma crescente e proporcional a uma redução deste parâmetro, até que sejam atingidos níveis considerados limitantes ao desenvolvimento dos fungos.

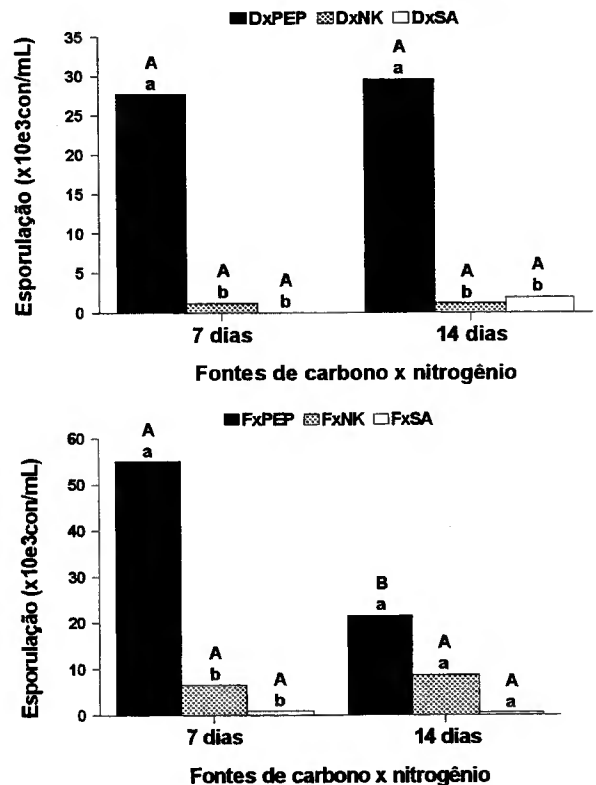


Figura 4 - Esporulação de *Bipolaris sacchari* em diferentes combinações de fontes de carbono e nitrogênio e períodos de incubação. Colunas seguidas da mesma letra, minúsculas dentro da categoria e maiúscula entre categorias, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0.05$ ). Dados transformados em  $\sqrt{x + 5}$ . DxP (dextrose-peptona); DxNK (dextrose-nitrato de potássio); DxSA (dextrose-sulfato de amônio); FxP (frutose-peptona); FxNK (frutose-nitrato de potássio); FxSA (frutose-sulfato de amônio).

## ABSTRACT

### Effect of culture media and carbon and nitrogen sources on *Bipolaris sacchari*, from *Pennisetum purpureum*

In this work the pathogenic and physiologic characteristic of an isolate of the fungus *Bipolaris sacchari*, agent of the elephant grass ocular spot (*Pennisetum purpureum*) were studied. The pathogenicity of the fungus was confirmed on plants of elephant grass cv. Elephant B(Mineirão). In the physiologic characterization, the behavior of the phytopathogen in five culture media (PDA, carrot, soybean, lactose-hydrolysed casein and V8) was evaluated using two incubation periods (seven and 14 days), as well as using a combination of two carbon sources (dextrose and fructose), and three nitrogen sources (peptone, potassium nitrate and ammonium sulfate) in absence of light (continuous

dark). In all trials, the average temperature was  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . The soybean and lactose-hydrolysed casein media, and in the combinations of carbone and nitrogen, where peptone was included, were the best conditions for the mycelial growth of *B. sacchari* at seven and 14 days of incubation. A high conidium production was obtained when the carrot medium was used ( $54.27 \times 10^3$  conidia/mL) at 14 days of incubation, as well as in the combination of carbone and nitrogen - fructose x peptone, at seven days of incubation ( $55.05 \times 10^3$  conidia/mL).

Key words: *Bipolaris sacchari*, *Pennisetum purpureum*, physiology

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AMORIM, E.P.R. et al. Influência do meio de cultura no crescimento, esporulação e características culturais de *Fusarium decemcellulare* hiperparasita de *Puccinia psidii*. *Ciência Agrícola*, v.1, p.15-20, 1991.
- 2 ARAÚJO, A.A. **Forrageiras para ceifa, capineiras, fenaças e silagens**. 2ª ed. Porto Alegre: Sulina, 1972. 262 p.
- 3 ATHAYDE SOBRINHO, C. **Caracterização patogênica, fisiológica e morfológica de um isolado de *Plenodomus destruens* Harter, agente causal da podridão do pé da batata-docê (*Ipomoeae batata* (L.) Lam.)**. 1994. 131f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1994.
- 4 BRUNKEN, J.N. A systematic study of *Pennisetum* sect. *Pennisetum* (graminae). *American Journal of Botany*, Columbus, v.64, p.161-176, 1977.
- 5 CARDOSO, V.A. **Influência de meios de cultura, luminosidade e fontes de carbono e nitrogênio sobre *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc., agente causal da antracnose da acerola (*Malpighia glabra* L.)**. 1995. 73f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1995.
- 6 CASTILHO, Z.M.S. **Capim elefante: estabelecimento, manejo e utilização**. Porto Alegre: Rebrote, 1987. 32 p.
- 7 COCHRANE, V.W. **Physiology of fungi**. New York: John Wiley & Sons, 1958. 542 p.
- 8 GONÇALVES, D.A.; MENEZES, G.M. O capim elefante (elephant grass). *Zoötecnica*, v.20, p.229-259, 1982.
- 9 HALMA, F.F.; FAWCETT, H.S. Relation of *Helminthosporium sacchari* to maintained temperature. *Phytopathology*, St. Paul, v.15, p.463-469, 1925.
- 10 JACQUES, A.V.A. Caracteres morfo-fisiológicos e suas implicações com o manejo. In: CARVALHO, M.M. et al. **Capim elefante: produção e utilização**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1994. p.31-47.
- 11 KURTZ, E.B.; FERGUS, C.L. Nitrogen nutrition of *Colletotrichum coccodes*. *Phytopathology*, St. Paul, v.54, p.691-692, 1964.
- 12 LILLY, V.G.; BARNETT, H.L. **Physiology of the fungi**. New York: McGraw Hill, 1951. 464 p.
- 13 LIMA, J.A.S. **Caracterização patogênica, fisiológica, cultural e isoesterásica de isolados de *Botryodiplodia theobromae* Pat., agente causal da morte descendente da mangueira (*Mangifera indica* L.)**. 1996. 128f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1996.
- 14 LOPES, A.S.; BERGAMIN FILHO, A. Efeito de meios de cultura e regimes de luz na esporulação de *Bipolaris sacchari*. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v.19, p.105-107, 1993.
- 15 LUTTRELL, E.S. Diseases of pearl millet in Georgia. *Plant Disease Reporter*, v.38, p.507-514, 1954.
- 16 MELO FILHO, R.M.; DUBEUX JR., J.C.B.; REIS, A.; MENEZES, M. Ocorrência da mancha de *Bipolaris sacchari* em *Pennisetum purpureum* e fontes de resistência ao patógeno em Pernambuco-Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.21, p.371, 1996 (Resumo).
- 17 PARRIS, G.K. Eye-spot of napier grass in Hawaii, caused by *Helminthosporium sacchari*. *Phytopathology*, St. Paul, v.32, p.46-62, 1941.
- 18 SANTOS, M.C.S. **Avaliação de 4 clones de *Pennisetum* sob diferentes níveis de estresse hídrico**. 1986. 117f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1996.
- 19 TANDON, R.N.; CHANDRA, S. The nutrition of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, Dordrecht, v.18, p.213-224, 1962.
- 20 TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v.2. p.207-225.