

USO DE DIFERENTES TIPOS DE MEIO DE CULTURA PARA ESPORULAÇÃO E CRESCIMENTO MICELIAL DE *Alternaria alternata*

Ariane do Carmo **SOUZA**¹

Leonardo Pires **BOAVA**²

RESUMO

O gênero *Alternaria* spp. é conhecido por sua perda na capacidade de esporulação frente a repicagens sucessivas e condições ambientes adversas. Para auxiliar a produção de conídios reprodutivos e aumentar a quantidade de esporulação do fungo, técnicas vêm sendo aprimoradas para facilitar as pesquisas com esse fitopatógeno. O objetivo da pesquisa foi testar a capacidade de esporulação e crescimento micelial de *Alternaria alternata*, através de oito diferentes meios de cultura. As metodologias empregadas para o desenvolvimento desse trabalho foram embasadas na produção de inóculo de *A. alternata* para avaliar o efeito de oito meios de cultura (testemunha BDA comercial, BDA batata, aveia, leite de coco, lantana, tomate, cenoura e mandioca) para avaliar o crescimento micelial, a velocidade de crescimento e a esporulação do fungo. Os resultados obtidos mostraram que os melhores meios de cultura para os três parâmetros avaliados são BDA batata, aveia e leite de coco.

Palavras-chave: Fitopatologia, fungos, *in vitro*.

¹ Estudante de Engenharia Agrônoma – Centro Universitário de Araras “Dr Edmundo Ulson” – UNAR (e-mail: arianedocarmosouza@gmail.com)

² Orientador e professor do Centro Universitário de Araras “Dr Edmundo Ulson” – UNAR (e-mail: leoboava@yahoo.com.br)

Recebido em: 11/10/2018 - Aceito para publicação em: 14/12/2018

ABSTRACT

The genus *Alternaria* spp. Is known for lose sporulation capacity against successive repetitions and adverse environmental conditions. To support the production of reproductive conidia and increase the amount od sporulation of the fungus, techniques have been improved to facilitate the research with this phyopathogen. The main objective of the research was to evaluate the sporulation capacity and mycelia growth of *Alternaria alternata* through eight different culture media. The methodologies employed for the development of this work were based on the production of inoculum of *A. alternata* to test the effect of eight culture media (commercial BDA, potato BDA, oat, coconut milk, lantana, tomato, carrot and cassava) to measure mycelia growth, growth rate and fungal sporulation. The results obtained showed that the best culture media for the three parameters evaluated are BDA potato, oats and coconut milk.

Keywords: Phythopathology; fungi; *in vitro*.

INTRODUÇÃO

O fungo *Alternaria alternata* é um microrganismo que apresenta diversas variações morfológicas e reprodutivas quando cultivado em meio de cultura, muitas vezes modificando seu hábito reprodutivo, que é a produção de conídios reprodutivos. Essas modificações morfológicas e reprodutivas apresentam um enorme gargalo quando se trabalha com *A. alternata* pois, muitas vezes o fungo não mantém seu crescimento constante e para de esporular inesperadamente, o que acarreta na dificuldade para se estudar seu patossistema.

O meio de cultura onde são repicados fungos fitopatogênicos é responsável pela eficiência do crescimento micelial e da quantidade de esporulação de fungos (DHINGRA & SINCLAIR, 1995). Entretanto, muitas vezes pesquisas são interrompidas pela perda da capacidade de produção de conídios e esporulação do fitopatógeno (ROTEM, 1994), como é o caso de *Alternaria alternata*.

A premissa básica para esporulação de fungos fitopatogênicos é criar ambientes adequados para o mesmo, de forma que consiga obter condições nutricionais, de temperatura e regime de luz que contribuam para isso. Considerando isso, o gênero *Alternaria* spp., compõe um dos gêneros que possuem diversas alterações no regime de crescimento e esporulação.

Os meios de cultura usualmente utilizados para repicagens de microrganismos são compostos por fontes de C,N, P, micronutrientes e vitaminas. Um meio de cultura equilibrado é fundamental para o crescimento micelial do fungos e esporulação dos mesmos em ambiente controlado. Em condições controladas, o fungo *A. alternata* apresenta crescimento micelial lento e baixa esporulação em meios de cultura convencionais (SILVA & MELO, 1999).

Para que haja pesquisa relacionada aos efeitos deletérios de fungos fitopatogênicos, faz-se necessária a investigação de metodologias que possibilitem o desenvolvimento de fungos em condições laboratoriais. Quanto à esporulação de conídios do gênero *Alternaria* spp. as metodologias utilizadas atualmente são metodologias que estressam o fungo e possibilitem sua esporulação, como exposição a luz ou escuro constante, injúrias nos conídios, temperaturas altas e baixas e repicagens em meios de cultura pobre em açúcar (ROTEM & BASHI, 1969).

Frente à dificuldade de manter seu crescimento micelial e esporulação constante sem que haja alterações morfofisiológicas, o presente trabalho objetivou o uso de diferentes meios de cultura para avaliar o crescimento micelial e esporulação de *A. alternata* em condições *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida nos laboratórios de aula da Faculdade Anhanguera em Leme, São Paulo. O isolado de *Alternaria alternata* que se

utilizou neste trabalho foi obtido através do isolamento de folhas de citros infectadas com o fitopatógeno no Estado de São Paulo.

Produção de inóculo

Os conídios do fitopatógeno foram produzidos em meio de cultura, seguindo a metodologia adotada por Canihos et al. (1999). Os conídios foram coletados através da adição de 10 mL de água destilada e esterilizada em cada placa de Petri. As colônias fúngicas foram raspadas com uma lâmina estéril e a suspensão filtrada para remoção dos fragmentos de micélio.

Avaliação dos diferentes meios de cultura para crescimento micelial de *A. alternata*

Para avaliar o desenvolvimento micelial e esporulação de *A. alternata* foram utilizados oito tratamentos. Os tratamentos foram:

- 1) meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) comercial - testemunha (200 g batata, 20g de dextrose/glicose, 15g de Agar e 1L de água destilada);
- 2) meio de cultura caldo de batata (200g de batata para 1L de água destilada, 20g de dextrose e 15g de ágar);
- 3) aveia ágar (32 g de farinha de aveia, 10 g de dextrose, 15 de ágar e 1 L de água destilada);
- 4) leite de coco ágar (150mL de leite de coco, 15g ágar e 1L de água destilada);
- 5) lantana ágar (200g de folhas de lantana, 15g agar e 1L de água destilada);
- 6) tomate ágar (100ml de suco de tomate, 3g de CaCO₃, 15g de ágar e 1L de água destilada);
- 7) meio de cenoura e ágar (200g de cenoura, 20g de ágar e 1L de água destilada);
- 8) mandioca ágar (200 g de mandioca, 20 g de dextrose, 17g de ágar e 1L de água destilada).

Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave por durante 15 minutos a 121°C.

As placas foram mantidas em câmara incubadora para BOD na temperatura de 27°C fotoperíodo 12/12h. Após 14 dias de incubação, foi adicionado 2mL de água destilada em cada placa de Petri para obtenção de uma suspensão de conídios. As suspensões foram visualizadas no microscópio óptico e foi realizada a contagem de conídios reprodutivos em câmara de Neubauer.

Taxa de crescimento individual de *Alternaria alternata*

O isolado de *Alternaria alternata* foi cultivado individualmente em todos os tratamentos em condições laboratoriais, para se determinar a curva e a taxa de crescimento diário do microrganismo. Discos de 5mm de diâmetro, contendo micélio do fungo, foram transferidos para o centro de placas de Petri. Em dois intervalos de tempo, 7 e 17 dias, foram efetuadas medidas dos diâmetros das colônias, em dois sentidos perpendiculares. A taxa de crescimento de cada organismo foi determinada aplicando-se a fórmula adaptada de Lilly & Barnett (1951):

$$T_{xc} = \frac{C_2 - C_1}{T_2 - T_1},$$

onde:

T_{xc} = taxa de crescimento;

C_2 = crescimento após 14 dias de incubação;

C_1 = crescimento após 7 dias de incubação;

T_2 = 14 dias e T_1 = 7 dias.

AVALIAÇÕES

As avaliações foram realizadas 7 dias após a montagem do experimento, por até 14 dias, através da medição do diâmetro médio da colônia do fungo e da contagem de conídios reprodutivos com o auxílio do microscópio óptico de luz e câmara de Neubauer.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância ANOVA com comparação de médias através do teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Os ensaios foram realizados duas vezes.

RESULTADOS

Produção de inóculo

Para dar início ao trabalho realizou-se a ativação do fungo a ser estudado, através de repicagens em meio de cultura BDA feito com caldo de batata. Durante esse processo, o fungo apresentou características morfológicas diferentes de sua forma original, apresentando uma contaminação com demais fungos crescendo juntos ao isolado. Para realizar a purificação do isolado fitopatogênico, foi necessário realizar uma diluição seriada com água destilada autoclavada, de modo a obter uma cultura monospórica do fungo. Após o cultivo monospórico, observou-se as estruturas crescidas em microscópio óptico. Dessa maneira pôde-se certificar que a cultura estava pura, ou seja, advinda de um único esporo de *Alternaria alternata* (Figura 1).

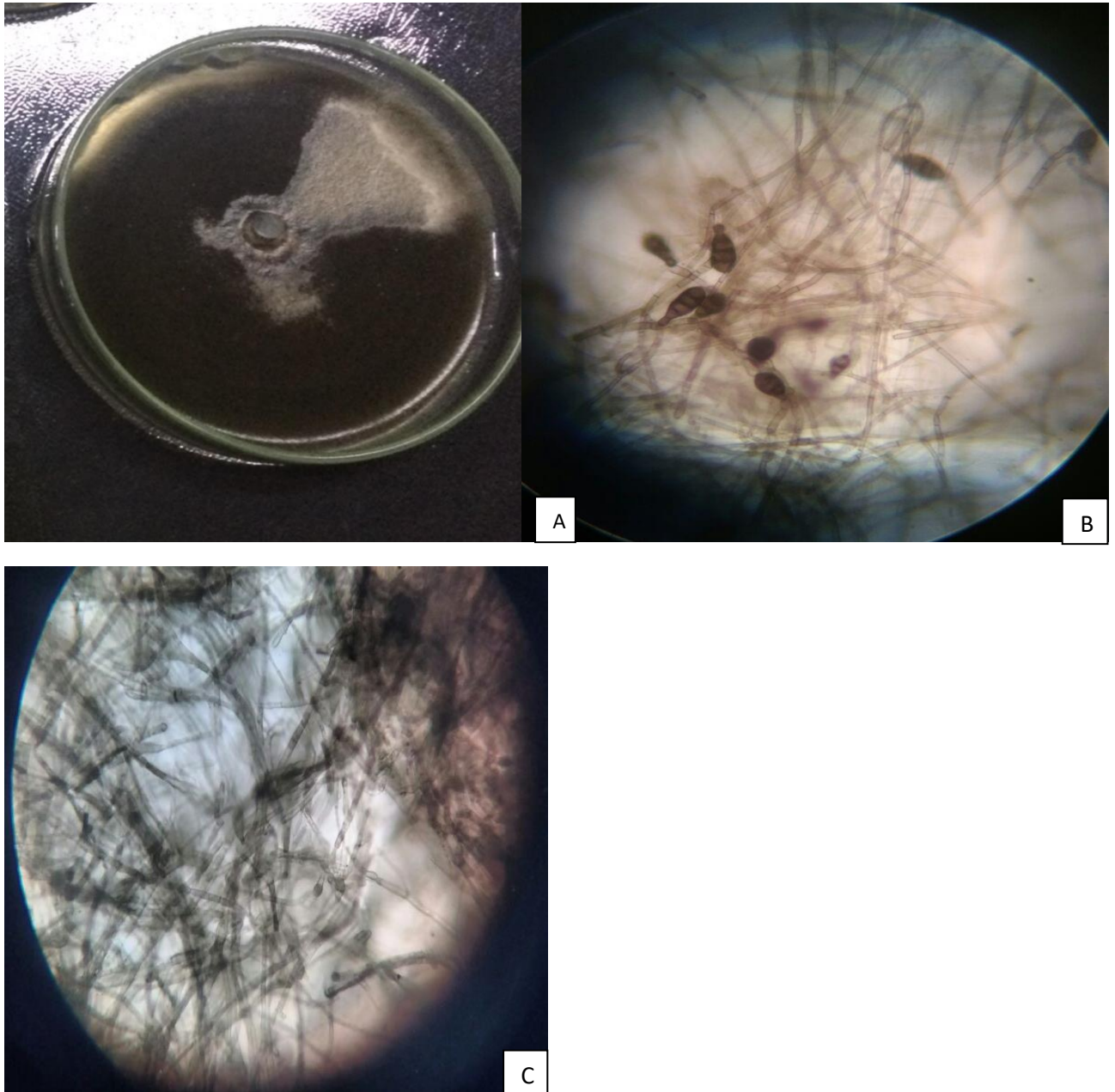


Figura 1. Processo de produção e purificação do isolado de *Alternaria alternata* .(A: Placa de Petri com crescimento micelial do fungo. B: Conídios de *A. alternata*. C: Hifas septadas).

A partir da purificação dos isolados, o desenvolvimento do trabalho pode dar início, de modo a avaliar os diferentes meios de cultura e se estes influenciariam na produção de conídios reprodutivos de *A. alternata*.

Avaliação dos diferentes meios de cultura para crescimento micelial de *A. alternata*

Os meios de cultura que possibilitaram maior crescimento micelial de *A. alternata* foram BDA caldo de batata, aveia ágar e leite de coco ágar sendo iguados estatisticamente, ao maior valor alcançado pela testemunha BDA comercial. DA SILVA & TEIXEIRA (2012), ao testarem diversos meios de cultura para crescimento micelial e esporulação de *Fusarium solani* encontram melhores resultados utilizando meio de cultura BDA que contribuiu para maior crescimento micelial para o fungo.

Os meios de cultura que apresentaram diferenças significativas no Ensaio I foram: lantana ágar, tomate ágar, cenoura ágar e mandioca ágar com diâmetro médio de 7,52 cm, 7,3 cm, 7,5 cm e 7,71 cm e 83,6%, 81,1%, 83,3% e 85,7% de crescimento na placa de Petri respectivamente (Figura 2). Já no ensaio II, todos os meios de cultura apresentaram crescimento micelial que se equipararam à testemunha com valores de porcentagem de crescimento na placa que variaram de 83,2% a 93,3%. Os dados obtidos não diferiram significativamente entre si.

O meio de cultura BDA comercial que é a testemunha de comparação possui uma simples formulação e elevado teor de nutrientes que possibilitou o melhor crescimento micelial de *A. alternata*. Tal resultado está de acordo com Sharma et al. (2018), que também relataram o melhor crescimento micelial de *Alternaria cucumerina* no meio de cultura BDA comercial.

Tabela 1. Crescimento micelial (cm) de *A. alternata* em diferentes meios de cultura em dois tipos de placa de Petri.

Tratamentos	Ensaio I		Ensaio II	
	Diâmetro médio da colônia do patógeno (cm)	(%) de crescimento na placa	Diâmetro médio da colônia do patógeno (cm)	(%) de crescimento na placa
Testemunha BDA comercial	8,08a*	89,8	7,49a	83,2
Caldo de batata	7,88ab	87,6	7,81a	86,8
Aveia ágar	8,17a	90,8	8,4a	93,3
Leite de coco ágar	7,67abc	85,2	8,19a	91,0
Lantana ágar	7,52bc	83,6	7,79a	86,6
Tomate ágar	7,3c	81,1	7,67a	85,2
Cenoura ágar	7,5bc	83,3	7,51a	83,4
Mandioca ágar	7,71bc	85,7	8,12a	90,2

*Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

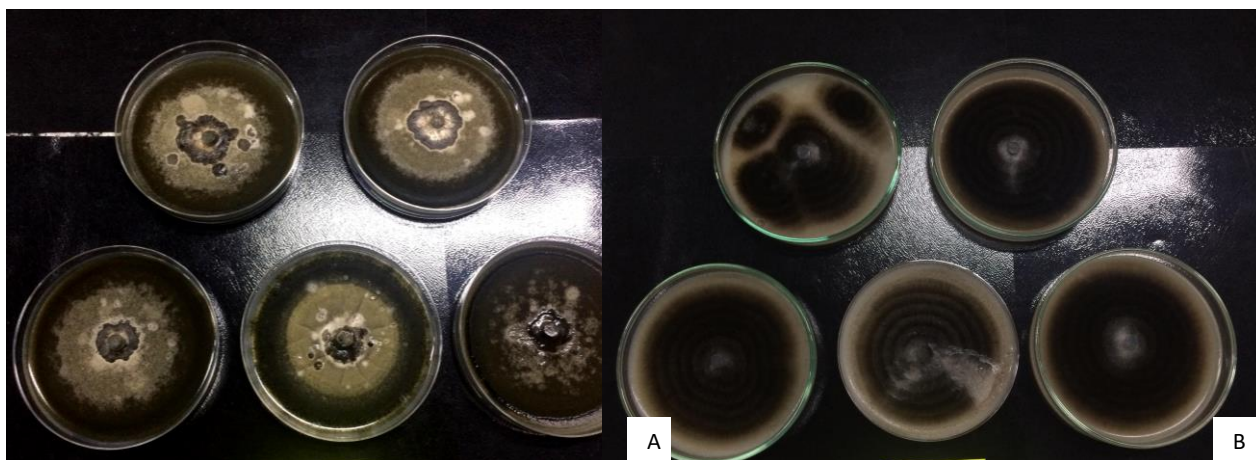


Figura 2. Avaliação do crescimento micelial de *A. alternata* através do diâmetro médio da colônia do fitopatógeno (A: Testemunha meio de cultura BDA comercial; B: meio de cultura de Tomate).

Avaliação dos diferentes meios de cultura para esporulação de *A. alternata*

Dentre os oito meios de cultura testados nos dois ensaios realizados, apenas dois apresentaram valores inferiores aos da testemunha de BDA comercial, sendo essa diferença apresentada pelos tratamentos de lantana ágar e mandioca ágar (Tabela 2). Estes resultados contrastam com o trabalho de Carnauba et al.,(2007) que encontraram valores de esporulação para meio de cultura a base de mandioca que foram superiores a grande maioria dos tratamentos testados. Já Dhingra & Sinclair (1985), afirmam que alguns meios de cultura a base de extratos vegetais costumam apresentar maiores valores de crescimento micelial e esporulação de fungos. Neste trabalho o meio de cultura a base de vegetal lantana ágar diferiu estatisticamente dos tratamentos e apresentou a menor esporulação.

De acordo com Nozaki et al. (2004), as condições ideais de crescimento micelial nem sempre são as mesmas para a esporulação de fungos. Esse fato não se repetiu neste trabalho, onde as condições nutricionais dos meios que apresentaram melhores taxas de crescimento micelial e esporulação foram advindos dos mesmos meios de cultura testados (testemunha BDA comercial, caldo de batata e aveia ágar).

Tabela 2. Quantidade de conídios de *A. alternata* nos diferentes meios de cultura. Dados transformados em $\sqrt{x+k}$, $k= 1$

Tratamentos	Ensaio I	Ensaio II
	Número de conídios (10^5) em 200ul	
Testemunha BDA comercial	132,2a*	58,2ab
Caldo de batata	64,4ab	51,6a
Aveia ágar	58,6ab	59a
Leite de coco ágar	27ab	26,8abc
Lantana ágar	16b	11,4c

Tomate ágar	44,2ab	42,4ab
Cenoura ágar	24,2ab	24,6abc
Mandioca ágar	17,4b	18,6bc

*Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Taxa de crescimento individual de *Alternaria alternata*

No ensaio I, dos oito tratamentos testados apenas o tratamento de mandioca não diferiu significativamente da testemunha, sendo o que mais se aproximou dos valores de crescimento alcançados pelo padrão de BDA comercial. Já o tratamento leite de coco apresentou uma melhor taxa no crescimento na placa de Petri, com 0,754cm. Já no ensaio II, três tratamentos diferiram significativamente da testemunha, sendo eles BDA batata, aveia e cenoura, com 0,208cm;0,182cm e 0,318cm respectivamente. Nesse segundo ensaio, o tratamento de leite de coco apresentou melhor eficiência na taxa de crescimento micelial, superando as taxas alcançadas pela testemunha (Tabela 3).

Contrastando com os resultados encontrados para esporulação de *A. dauci* por Pulz & Massola Jr. (2009), neste trabalho, o meio de cultura BDA comercial manteve o segundo melhor resultado em taxa de crescimento micelial de *A. alternata*.

Tabela 3. Taxa de crescimento micelial de *A. alternata* em 14 dias em diferentes tipos de meio de cultura.

Tratamentos	Ensaio I	Ensaio II
	Taxa de crescimento (cm)	Taxa de crescimento (cm)
Testemunha BDA comercial	0,648b*	0,57b
Caldo de batata	0,216e	0,208d
Aveia ágar	0,134e	0,182d
Leite de coco ágar	0,754a	0,852a
Lantana ágar	0,470c	0,492bc
Tomate ágar	0,432c	0,49bc
Cenoura ágar	0,33d	0,318cd
Mandioca ágar	0,624b	0,676ab

*Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

CONCLUSÃO

De acordo com esse trabalho pode-se concluir que meios de cultura a base de batata, leite de coco, aveia, juntamente com meio de cultura BDA comercial podem ser empregados para usos laboratoriais sem que seja afetado o crescimento micelial e esporulação de *A. alternata*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CANIHOS, Y., PEEVER, T.L.; TIMMER, L.W. Temperature, leaf wetness, and isolate effects on infection of *Minneola* tangelo leaves by *Alternaria* sp. **Plant Disease**, v.83, p.429-433, 1999.

CARNAÚBA, J. P., SOBRAL, M. F., AMORIM, E. D. R., SILVA, J. C., SANTOS, V. B., & FÉLIX, K. D. S. Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Scytalidium lignicola*. **Summa Phytopathol**, v. 33, p. 199-200, 2007.

DA SILVA, J. L.; TEIXEIRA, R. N. V. Esporulação e crescimento micelial de *Fusarium solani* em diferentes meios de cultura e regimes de luminosidade. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 6, n. 1, p. 47-52, 2012.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic Plant Pathology Methods**. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida. 1995.

HANADA, ROGÉRIO E.; GASPAROTTO, LUADIR; PEREIRA, JOSÉ CLÉRIO R. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 170-173, 2002.

LILLY, V. G., BARNETT, H. L. Physiology of the fungi. **Physiology of the fungi**., 1951.

NOZAKI, M. H.; CAMARGO, M. E.; BARRETO, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes meios de cultura, condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira**, v.29 p. 429-432, 2004.

PULZ, P.; MASSOLA JR, N. S. Efeito de meios de cultura e fatores físicos no crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *A. solani*. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 2, p. 121-126, 2009.

ROTEM, J. **The genus *Alternaria*: biology, epidemiology, and pathogenicity**. American Phytopathological Society, 1994.

ROTEM, J.; BASHI, E. Induction of sporulation of *Alternaria porri* f. sp. *solani* by inhibition of its vegetative development. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 53, n. 3, p. 433-439, 1969.

SHARMA, S.; SAINI, P.; KUMAR, A.; SINGH, R.; PANDYA, R.K.. Assessment of Different Culture Media on the Growth and Sporulation of *Alternaria cucumerina* var. *cyamopsidis* causing *Alternaria* blight of Clusterbean. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. 7(09):3308-3313, 2018. <10.20546/ijcmas.2018.709.410>

SILVA, C. M. M.; MELO, I. S. Requisitos nutricionais para o fungo *Alternaria alternata*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 3, p. 499-503, 1999.