

INFLUÊNCIA DE MEIOS NUTRITIVOS NO DESENVOLVIMENTO E ESPORULAÇÃO DE CULTURAS DE *Fusarium solani* f. *piperi*¹

MARIA DE LOURDES REIS DUARTE* e FERNANDO CARNEIRO DE ALBUQUERQUE*

SINOPSE.— Estudos sobre o comportamento fisiológico de *Fusarium solani* f. *piperi* foram feitos em laboratório, em Belém, Pará, tendo sido utilizados seis tipos de meios sólidos sintéticos. Com o objetivo de uniformizar a reação dos meios nutritivos, antes da esterilização o pH foi elevado até próximo do valor neutro, pela adição de gotas de uma solução de hidróxido de potássio a 20%.

A avaliação dos resultados foi feita em relação ao diâmetro médio e peso seco das culturas, número de esporos formados e velocidade de germinação dos esporos nos diferentes meios nutritivos. Não houve relação entre o diâmetro médio e peso seco das colônias, velocidade de germinação e número de esporos por campo de 100 micra de diâmetro. A velocidade de germinação não foi a mesma nos diversos meios utilizados. A emissão do tubo germinativo ocorreu com maior frequência através da célula apical do esporo.

Palavras-chaves adicionais para índice: Pimenta-do-reino, *Piper nigrum* L., *Fusarium solani* f. *piperi*, fisiologia dos fungos.

INTRODUÇÃO

A podridão das raízes e do pé da pimenta-do-reino, causada por *Fusarium solani* f. *piperi*, tem dizimado grande número de pimentais instalados nas regiões Bragantina e Guajará, onde o tipo de solo característico é o Latossolo Amarelo de textura leve e fertilidade baixa. Calcula-se que os prejuízos monetários já causados, desde a constatação da moléstia até março de 1972, alcançam valor superior a Cr\$ 1.800.000,00, estimando-se que 15% das pimenteiros cultivadas no Estado do Pará tenham sido afetadas.

Embora a enfermidade ocorresse desde 1956 no Município de Tomé-Açu, o maior produtor de pimenta-do-reino no Estado do Pará, seu agente causal, o fungo *F. solani* f. *piperi*, só foi isolado em 1960 (Albuquerque 1961), de raízes apodrecidas de pimenteiros provenientes do município de Santa Izabel do Pará. Recentemente este fungo vem também acarretando o secamento dos ramos, pois se adaptou à disseminação aérea.

Trabalhos sobre infecção de plantas causada por fungos do gênero *Fusarium* têm mostrado que sua permanência dos solos infetados é assegurada pela produção abundante de estruturas reprodutivas do patógeno, principalmente os clamidósporos, que são os responsáveis pelo alastramento da moléstia nas áreas cultivadas (McKeen & Wensley 1961), permanecendo viáveis até 17 anos, sem apresentarem alterações morfológicas. Gonçalves (1964), estudando o *F. solani* f. *piperi*, observou que a solução de Richard modificada favorecia o isolamento

deste microrganismo com a inibição completa de outros fungos.

O conhecimento da fisiologia do patógeno, aliado ao estudo das condições ambientais ótimas para o desenvolvimento de microrganismos (pH, umidade e temperatura do solo e do ar), tem permitido recomendar práticas culturais e medidas de controle adequadas e viáveis para a enfermidade.

O presente trabalho, desenvolvido no Instituto de Pesquisas Agropecuárias do Norte (IPEAN), em Belém, Pará, teve por objetivo estudar as características fisiológicas do patógeno *F. solani* f. *piperi*, em cultivos purificados, em meios sintéticos usuais, no laboratório, visando trabalhos de inoculação, testes de fungicidas *in vitro* e obtenção de culturas monospóricas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas culturas monospóricas de *Fusarium solani* f. *piperi*, que se desenvolveram por oito dias em meios sólidos sintéticos de laboratório. As culturas monospóricas foram obtidas de macroconídios, semeados em placas de ágar e separados com auxílio de uma alça de platina com a extremidade achatada. Os meios em que as colônias se desenvolveram foram: Richard solidificado, Sabouraud, milho-ágar (MA), batata-dextrose-ágar (PDA), batata-dextrose-ágar peptonizado (PDA + PEP) e milho-dextrose-ágar (MDA).

Após o preparo dos meios nutritivos, obteve-se o pH dos mesmos pelo processo colorimétrico. Em seguida o pH de cada meio de cultura foi elevado até a neutralidade, pela adição de gotas de uma solução de hidróxido de potássio a 20%. Após a esterilização, tomaram-se novas medidas do pH de todos os meios (Quadro 1). Para facilitar a retirada das colônias, o meio foi dissolvido à chama de uma lamparina de álcool.

Efetuada a mensuração, as colônias permaneceram em estufas a 50°C, durante uma semana, para avaliação do peso seco do micélio e dos esporos com o mínimo de umidade.

¹ Aceito para publicação em 12 de março de 1974.

Apresentado na XIV Reunião da S.B.P.C., São Paulo, 2 a 8 de julho, 1972.

* Eng.º Agrônomo da Seção de Fitopatologia e Virologia do Instituto de Pesquisas Agropecuárias do Norte (IPEAN), Cx. Postal 48, Belém, Pará, e Professor de Fitopatologia e Microbiologia da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará (FCAP).

* Eng.º Agrônomo, Chefe da Seção de Fitopatologia e Virologia do IPEAN, Professor de Fitopatologia e Microbiologia da FCAP e Chefe de Pesquisas, bolsista, do Conselho Nacional de Pesquisas.

QUADRO 1. Medidas de pH após a esterilização e início da germinação dos esporos de *F. solani* f. *piperi*, após o semeio nos diferentes meios sintéticos

Especificações	PDA + PEP	Sabouraud	PDA	Richard	MDA	MA
pH	5,8	6,0	5,8	6,2	5,8	5,8
Semeio (hs)	8,45	8,20	8,45	8,15	8,45	8,20
Início da germinação (hs)	9,00	9,00	10,45	9,15	10,00	1,50

A contagem do número de esporos por campo de 100 micra de diâmetro foi efetuada utilizando-se a lente micrométrica comum. Para observação da velocidade de germinação, adicionou-se à superfície do meio de cultura teste, contido na placa de petri, suspensão de esporos de *F. solani* f. *piperi*, tendo-se a precaução de não deixar lâmina d'água sobre a placa de petri, de modo que os esporos germinaram diretamente sobre o meio de cultura. Em espaço de tempo preestabelecido, a partir da hora em que foi colocada a suspensão de esporos na placa, foi efetuada a mensuração do comprimento dos tubos germinativos emitidos das células apical e basal.

O delineamento usado foi inteiramente casualizado com 12 repetições para peso seco e diâmetro das colônias, 10 repetições para número de esporos por campo de 100 micra de diâmetro e o teste de significância aplicado foi o de Tukey ao nível de 5%.

RESULTADOS

No Quadro 2 são apresentados os resultados da avaliação do peso seco, número de esporos e diâmetro das colônias de *F. solani* f. *piperi*. Os dados foram obtidos uma semana após o início do ensaio. Verificou-se que as análises de variância do peso seco, diâmetro das colônias e número de esporos mostraram diferenças significativas entre os meios sintéticos usados (Quadro 3).

Após a esterilização, houve variação do pH entre os meios de cultura, ficando os índices compreendidos entre 5,8 e 6,2 (Quadro 1).

A determinação do espaço de tempo entre a hora do semeio dos esporos na superfície do meio de cultura contido na placa de petri e o início da germinação também variou entre os diferentes meios, sendo maior quando os esporos germinaram entre batata-dextrose-água (Quadro 1).

DISCUSSÃO

As determinações do peso seco e diâmetro das colônias de *F. solani* f. *piperi* foram feitas isoladamente, para cada meio sintético usado.

Comparando-se batata-dextrose-água peptonizado e Sabouraud, observou-se que o primeiro meio apresentou maior peso seco e maior diâmetro em relação ao segundo; batata-dextrose-água apresentou maior diâmetro, porém, menor peso seco em relação a Richard solidificado; nos meios de milho-dextrose-água e milho-água, o fungo *F. solani* f. *piperi* apresentou micélio intramatriçal, porém, naquele apresentou maior peso seco que neste (Fig. 1).

Na determinação do número médio de esporos, batata-dextrose-água peptonizado, Sabouraud, batata-dextrose-água e Richard solidificado favoreceram a esporulação, enquanto que em milho-dextrose-água e milho-água o número de esporos formados foi menor (Quadro 3, Fig. 1).

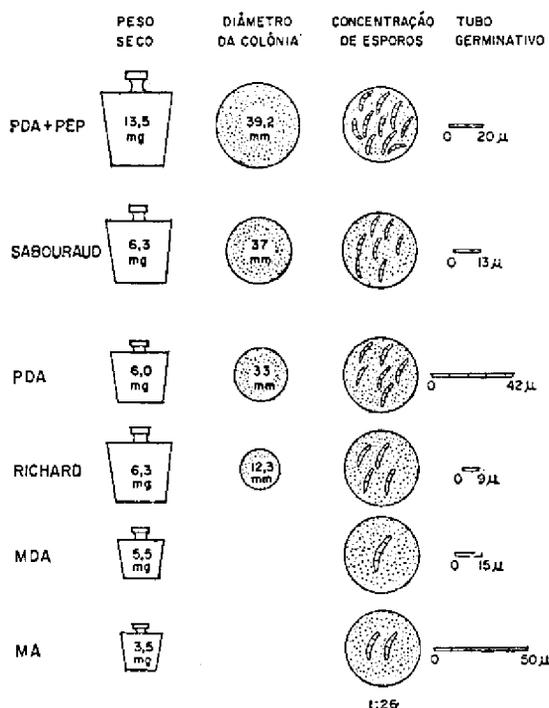


FIG. 1. Comparação do desenvolvimento de *Fusarium solani* f. *piperi* em diferentes meios de cultura.

É interessante ressaltar que o meio Richard é muito usado para cultivar fungos do gênero *Fusarium*, quando se deseja efetuar trabalhos de inoculação, porque favorece a esporulação. A espécie *F. solani* f. *piperi* esporula muito bem neste meio, conforme observação feita em estudos anteriores (Gonçalves 1964); entretanto, no presente trabalho, entre os meios que mais favoreceram a esporulação, o de Richard se situou como menos eficiente, provavelmente porque foi feito um aumento acentuado do pH de 4,2 para 6,2, fato que contribuiu para reduzir a esporulação deste microrganismo patogênico.

QUADRO 2. Valores para peso seco, diâmetro e número de esporos por campo de 100 micra de diâmetro das colônias de *Fusarium solani* f. *piperi*

N.º da amostra	PDA + PEP			Sabouraud			PDA			Richard			MDA			MA		
	Peso seco (mg)	Diâmetro (mm)	N.º de esporos p/campo	Peso seco (mg)	Diâmetro (mm)	N.º de esporos p/campo	Peso seco (mg)	Diâmetro (mm)	N.º de esporos p/campo	Peso seco (mg)	Diâmetro (mm)	N.º de esporos p/campo	Peso seco (mg)	Diâmetro (mm)	N.º de esporos p/campo	Peso seco (mg)	Diâmetro (mm)	N.º de esporos p/campo
1	10,2	35,5	346	6,0	37,5	155	8,0	26,0	137	5,0	31	110	5,0	colôn. ténue	3,0	colôn. ténue	38	
2	10,2	35,0	255	6,0	38,5	141	8,5	24,5	167	6,0	32	102	6,0	4,0	4,0	4,0	47	
3	18,0	36,5	224	5,0	32,5	201	5,0	26,0	134	7,0	32	94	7,0	5,0	4,0	4,0	55	
4	24,0	32,5	260	8,0	36,5	183	5,0	15,5	230	5,0	35	100	5,0	5,0	4,0	4,0	44	
5	15,0	38,0	202	5,0	35,5	138	8,0	16,0	170	6,0	33	114	6,0	8,0	4,0	4,0	48	
6	15,0	35,5	216	9,0	34,5	198	6,5	18,0	121	5,0	43	113	7,0	7,0	4,0	4,0	37	
7	15,0	36,0	247	7,0	40,0	193	5,0	18,0	144	7,0	28	100	7,0	5,0	3,0	3,0	74	
8	15,0	35,5	153	6,0	47,0	150	7,0	27,0	186	8,0	30	101	8,0	7,0	3,0	3,0	38	
9	17,0	38,0	274	5,0	37,0	198	5,0	17,0	157	6,0	33	102	6,0	4,0	4,0	4,0	42	
10	12,3	40,0	279	6,0	42,4	162	5,0	17,0	174	8,0	29	117	8,0	5,0	3,0	3,0	45	
11	14,3	43,5	—	7,0	41,0	—	5,0	12,0	—	7,0	39	—	7,0	5,0	3,0	3,0	—	
12	16,3	38,0	—	6,0	48,0	—	4,0	14,0	—	6,0	33	—	6,0	6,0	3,0	3,0	—	

Os esporos germinam mais rapidamente quando semeados em batata-dextrose-ágar peptonizado. Seguem-se em ordem decrescente de velocidade de germinação: milho-ágar, Sabouraud, Richard solidificado e milho-dextrose-ágar, sendo mais lento em batata-dextrose-ágar (Quadro 1, Fig. 2).

QUADRO 3. Resumo das análises de variância e média dos valores encontrados para as características fisiológicas de *Fusarium solani* f. *piperi* apresentados no Quadro 2

Meios de cultura	Diâmetro (mm)	Peso seco (mg)	Número de esporos por campo
PDA + PEP	39,2	13,5	255,6
Sabouraud	37,0	6,3	172,5
PDA	33,2	6,0	162,0
Richard	19,3	6,3	105,3
MDA	Col. tênue	5,5	26,4
MA	" "	3,5	46,0
C.V.%	13,0	24,0	24,0
F	a.s.*	a.s.	a.s.
Tukey 5%	4,7	2,2	40,2

* a.s. = altamente significativo.

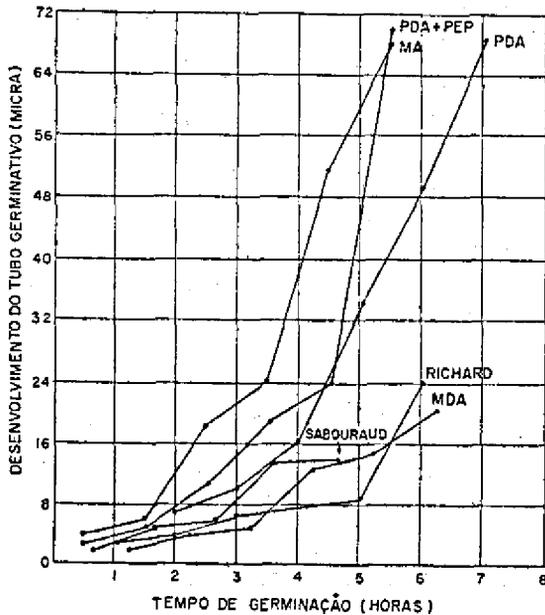


FIG. 2. Desenvolvimento do tubo germinativo, emitido da célula apical de macroconídios de *Fusarium solani* f. *piperi*, em substratos diferentes.

Após a emissão do tubo germinativo, a rapidez de desenvolvimento varia. Em batata-dextrose-ágar e milho-ágar alcançaram os maiores tamanhos, enquanto que em Richard solidificado, Sabouraud, milho-dextrose-ágar e batata-dextrose-ágar peptonizado o crescimento foi lento (Quadro 4, Fig. 3).

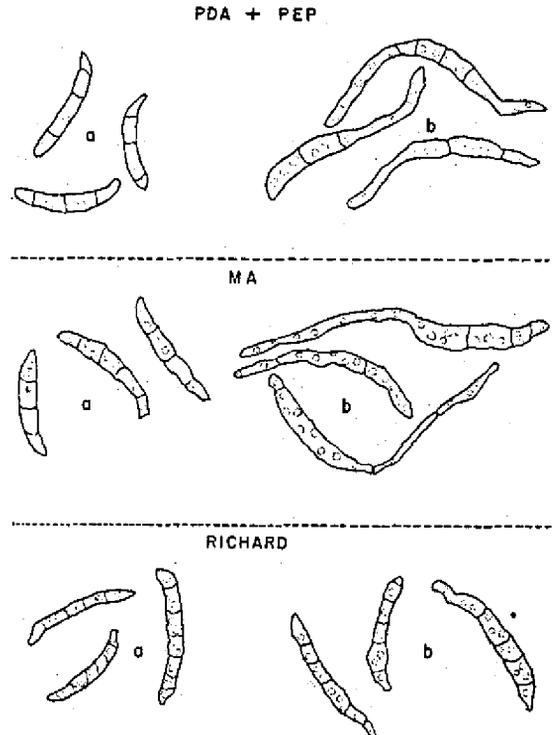


FIG. 3. A velocidade da germinação de *Fusarium solani* f. *piperi* nos meios nutritivos usados: a) 1 hora após a colocação da suspensão de esporos no meio teste; b) 4 horas após a colocação da suspensão de esporos no meio teste.

QUADRO 4. Comprimento e largura, médios, do tubo germinativo de *F. solani* f. *piperi* nas primeiras horas após o início da germinação, nos diferentes meios de cultura utilizados

Meios de cultura	N.º de horas	Comprimento médio (µm)	Largura média (µm)
PDA + PEP	1	5,2	3,4
	2	11,2	6,0
	3	19,2	11,0
	4	23,8	19,2
Sabouraud	1	5,4	3,6
	2	15,8	3,8
	3	18,8	4,0
	4	13,2	4,0
PDA	1	9,6	3,6
	2	16,3	6,0
	3	34,0	11,0
	4	47,4	19,2
Richard	1	3,4	2,0
	2	7,8	2,2
	3	8,3	2,6
	4	9,0	2,7
MDA	1	2,8	1,8
	2	5,0	2,4
	3	18,8	4,2
	4	14,8	6,8
MA	1	6,4	2,0
	2	17,9	6,2
	3	23,6	13,1
	4	81,8	15,4

CONCLUSÕES

Das observações efetuadas durante o desenvolvimento deste trabalho, pode-se concluir que:

- a) quanto maior o diâmetro da colônia, maior será o peso seco;
- b) o pH do meio não tem influência sobre a velocidade de germinação do esporo;
- c) a rapidez com que o esporo germina depende das substâncias constituintes do meio de cultura;
- d) a formação de esporos depende do pH e das substâncias contidas no meio nutritivo;
- e) não há relação entre o peso seco, diâmetro da colônia, número de esporos por campo e comprimento do tubo germinativo de *F. solani* f. *piperi*;
- f) a emissão do tubo germinativo, na maioria das vezes, inicia-se pela célula apical do esporo; depois que o tubo germinativo se encontra bem desenvolvido é que se verifica a germinação da célula basal (Fig. 3); raramente as células intermediárias emitem tubo germinativo;

g) os esporos, quando semeados em meio Sabouraud, iniciaram a germinação quarenta minutos após o semeio; em outros meios, como milho-ágar e batata-dextrose-ágar peptonizado, o processo é ligeiramente acelerado; em batata-dextrose-ágar é mais retardado do que em Richard solidificado e milho-dextrose-ágar, nos quais a germinação é iniciada depois de uma hora (Quadro 1);

h) para trabalhos de inoculação, teste de fungicidas e obtenção de culturas monospóricas, os meios mais adequados são batata-dextrose-ágar peptonizado, Sabouraud, batata-dextrose-ágar e Richard solidificado, por produzirem grandes quantidades de microconídios (Quadro 3, Fig. 1).

REFERÊNCIAS

- Albuquerque, F.C. 1961. Podridão das raízes e do pé da pimenta-do-reino, Circ. 5, Inst. Agron. Norte, Belém. 45 p.
- Gonçalves, J.R.C. 1964. Meio de cultura específico para o isolamento de *Fusarium solani* f. *piperi* de amostras de solo. Anais XIV Congr. Soc. Bot. Brasil, Manaus, 1963, p. 51-52.
- Mckeen, C.D. & Wensley, R.N. 1961. Longevity of *Fusarium oxysporum* in soil tube culture. Science 134:1528-1529.

ABSTRACT.- Duarte, M.de L.R.; Albuquerque, F.C.de [The influence of nutrient media on the development and sporulation of *Fusarium solani* f. *piperi* cultures]. Influência de meios nutritivos no desenvolvimento e esporulação de culturas de *Fusarium solani* f. *piperi*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Agronomia, (1975) 10, 1-5 [Pt. en] EMBRAPA, Cx. Postal 48, Belém, Pará, Brazil.

Laboratory studies on the physiological behavior of the fungus *Fusarium solani* f. *piperi*, the etiological agent responsible for the root-and-foot rot and the stem drying of black pepper vines in the field, were made by utilizing six different kinds of solid synthetic media. In order to create a uniform hydrogen reaction in the nutrient media before sterilization, the pH was raised almost to the neutral point by adding drops of a 20% potassium hydroxide solution.

Evaluation of the results was made considering the average diameter and dry weight of the cultures, as well as the number of spores formed and the speed of their germination in the different nutrient media.

There is no relation between the diameter and dry weight of the spore colonies, the speed of germination and the number of spores per field of 100 micra diameter. Depending on the media utilized, the spores have demonstrated different speed of germination. The germinative tube first appears more frequently through the apical cell of the spore.

Additional index words: Black pepper, *Piper nigrum* L., *Fusarium solani* f. *piperi*, physiology of fungus.