

INDUÇÃO DA ESPORULAÇÃO DE CULTURAS DE *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES* PENZ PRESERVADAS EM ÓLEO MINERAL¹

MARILENE FERREIRA DA SILVA², DÉBORA M. MASSA LIMA³ e MARIA AUXILIADORA CAVALCANTI⁴

RESUMO - Estudos foram realizados com quatro amostras não-esporuladas de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, preservadas em óleo mineral durante 34 e 36 anos, pertencentes ao acervo da Micoteca URM, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, com o fim de obter culturas esporuladas. Na indução para obtenção de estruturas reprodutivas, foram utilizadas, como substrato, folhas de mamoeiro (*Carica papaya* L.) hidratadas com uma suspensão micelial de *C. gloeosporioides* e extrato de folha de mamoeiro. Após indução, culturas esporuladas foram obtidas nos meios de batata-dextrose-ágar (BDA) e de aveia-sais minerais-ágar (ASMA-A). Verificou-se que no meio de ASMA-A, houve um aumento considerável de esporos, quando comparado com o meio de BDA.

Termos para indexação: Micologia, folhas de mamoeiro, meios de cultura.

INDUCTION OF THE SPORULATION IN *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES* PENZ, PRESERVED UNDER MINERAL OIL

ABSTRACT - Studies were made with four unsporulated cultures of *Colletotrichum gloeosporioides* preserved under mineral oil during thirty-four to thirty-six years. Those cultures belonged to the collection of the "Mycotheca" of the Mycology Department of the Federal University of Pernambuco. To induce sporulation, leaves of papaya (*Carica papaya* L.) hydrated with mycelial suspension of the *C. gloeosporioides* and extract of leaves of papaya were used. After induction, sporulated cultures were obtained in the media potato-dextrose-agar (BDA) and oatmeal-mineral-salts-agar (ASMA-A). Most sporulation was observed in ASMA-A.

Index terms: Mycology, papaya leaves, culture media.

INTRODUÇÃO

Uma das preocupações dos micologistas e fitopatologistas tem sido a manutenção de culturas de fungos sem que haja modificação dos seus caracteres primordiais. A escolha de mé-

todos de preservação, bem como os cuidados a serem tomados durante o seu processamento, pode ter um decisivo efeito sobre a sobrevivência e manutenção das características morfológicas e fisiológicas dos fungos cultivados.

Estudos têm demonstrado que o percentual de viabilidade de culturas de fungos depende, entre outros fatores, do número de esporos apresentados durante a estocagem (Windels et al. 1988). Assim, atenção especial deve ser dada nesse sentido, notadamente quando grande quantidade de esporos é requerida para se dar início a trabalhos de pesquisa. Recentemente, através de testes realizados sobre a manutenção da viabilidade de fungos fitopató-

¹ Aceito para publicação em 21 de junho de 1991.

² Bióloga, M.Sc., Dep. Micologia, Centro de Ciências Biológicas da UFPE, Av. Prof. Artur de Sá, Cidade Universitária, CEP 50739, Recife, PE. Bolsista do CNPq.

³ Bióloga, M.Sc., Profa.-Adj., Dep. de Micol., CCB da UFPE.

⁴ Micologista, Dra., Profa.-Adj., Dep. de Micologia, CCB UFPE.

genos preservados em óleo mineral na Micoteca do Departamento de Micologia da UFPE, observou-se que algumas culturas de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. foram preservadas com ausência de estruturas reprodutivas.

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver um método eficiente para indução da esporulação dessas culturas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas culturas de *C. gloeosporioides*, depositadas na Micoteca URM, do Departamento de Micologia da UFPE, preservadas em óleo mineral durante 34 e 36 anos, registradas sob os números 051, 094, 097, sem referência com relação aos hospedeiros, e 652 isolados de *Persia gratissima*. Inóculos dessas culturas foram transferidos para caldo glicosado, e, após crescimento, repicados para os meios de batata-dextrose-ágar-BDA – e aveia com sais minerais ágar A – ASMA-A – (Weitzman & Silva-Hutner 1967), contidos em tubos de ensaio.

Na indução de esporulação, utilizaram-se folhas de mamoeiro (*Carica papaya* L.) desinfectadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 10%, as quais foram cortadas em pequenos fragmentos e transferidas para placas-de-petri com papel de filtro. Para maior segurança quanto à assepsia, as placas contendo os fragmentos das folhas foram autoclavadas a 1 atmosfera de pressão, durante 20 minutos.

As inoculações dessas folhas foram feitas utilizando-se massa micelial de cada uma das amostras de *C. gloeosporioides* suspensa em extrato de folha de mamoeiro, obtido pela fervura de 100 g de folha/500 ml de água destilada e autoclavado a 120°C durante 20 minutos. As placas foram mantidas à temperatura ambiente ($\pm 28^\circ\text{C}$), e, quando necessário fazia-se a hidratação com extrato de folhas de mamoeiro. Após oito dias de incubação, as frutificações produzidas foram transferidas com um estilete de ponta fina e sob binocular estereoscópica, para os meios de BDA e ASMA-A, e incubadas à temperatura ambiente. Para cada meio foram feitas três repetições.

As testemunhas receberam o mesmo tratamento, não sendo utilizada, entretanto, a suspensão micelial.

Os resultados foram aferidos aos oito dias de incubação, acrescentando-se a cada placa 10 ml de água destilada esterilizada, e com uma alça de platina fez-se a raspagem da superfície das colônias desen-

volidas tanto nos meios BDA e ASMA-A como sobre folhas de mamoeiro. O número total de conídios produzidos por placas foi detectado em câmara de Neubauer, utilizando-se uma alíquota de 0,05 ml de cada suspensão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As culturas de *C. gloeosporioides* (051, 094, 097, 652), inicialmente desenvolvidas em placas-de-petri com meios de BDA e ASMA-A, não apresentaram estruturas reprodutivas (Fig. 1); no entanto, essas mesmas amostras, quando inoculadas em folhas destacadas mais extrato de folha de mamoeiro, apresentaram esporulação no oitavo dia de incubação (Fig. 2).

A partir das estruturas reprodutivas observadas no material induzido e incubadas em BDA e ASMA-A, obtiveram-se culturas esporuladas de *C. gloeosporioides* (Fig. 3).

O número total de conídios produzidos, tanto no substrato natural, como nos meios de BDA e ASMA-A antes e após indução no substrato natural, está evidenciado na Tabela 1, constatando-se que no meio de ASMA-A houve um aumento considerável de esporos, em comparação com o meio de BDA.

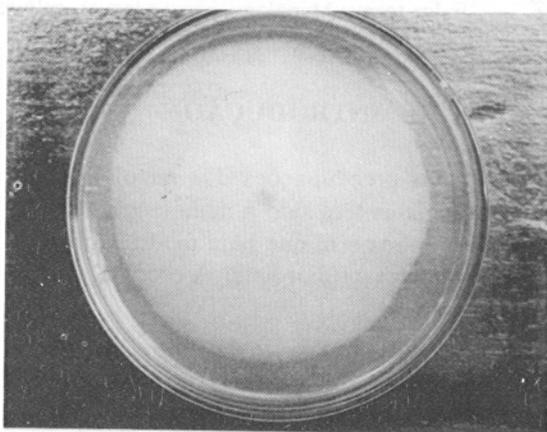


FIG. 1. Colônia de *C. gloeosporioides* em meio de ASMA-A, observando-se apenas a fase vegetativa.



FIG. 2. Produção de conídios de *C. gloeosporioides* sobre folhas destacadas mais extrato de folhas de mamoeiro sobrepostas em papel de filtro, contidas em placas-de-petri.

O grande número de esporos produzidos pelas amostras de *C. gloeosporioides* nos meios de BDA e ASMA-A após indução em folhas de mamoeiro leva a crer que o processo reprodutivo se encontrava bloqueado pelo fato de essas culturas terem sido preservadas em óleo mineral, possivelmente sem apresentarem



FIG. 3. Colônia de *C. gloeosporioides* em meio de ASMA-A, mostrando grande número de conídios em acérvulos, produzidos a partir das frutificações desenvolvidas em folhas destacadas.

estruturas reprodutivas, e que, após terem sido inoculadas em seu substrato natural (folhas de mamoeiro), houve desativação do bloqueio da

TABELA 1. Esporulação de 4 amostras de *C. gloeosporioides*, preservadas em óleo mineral durante 34 e 36 anos, nos meios de BDA e ASMA-A, antes e após indução em folhas destacadas + extrato de folhas de mamoeiro.

Nº das amostras	Período de estocagem (anos)	Nº de esporos/ml por placa (x 10 ⁶)*				
		Antes da indução em substrato natural		Induzidos Substrato natural (folhas + extrato folhas mamoeiro)	Após indução em substrato natural	
		BDA	ASMA-A		BDA	ASMA-A
051	36	0	0	7,9	7,5	13,8
094	36	0	0	7,9	5,9	16,7
097	36	0	0	10,0	7,1	16,8
652	34	0	0	7,2	6,3	19,7

* Média de três repetições.

esporulação, a qual passou a ser ativa em meios de cultura artificiais.

Vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos utilizando-se diferentes substâncias nutritivas e fatores físicos para indução de esporulação de espécies de *Colletotrichum* (Singh & Garraway 1975, Roy 1977, Rajak 1983, Ahmed 1985, Singh et al. 1987). Shukla (1972), trabalhando com *C. gloeosporioides*, verificou a ação estimulante de vitaminas, principalmente biotina, tiamina e riboflavina, sobre a produção de esporos. Rajak (1983) obteve máxima esporulação de *C. gloeosporioides* quando utilizou meios de cultura contendo ramnose e arabinose como fontes de carbono, enquanto Singh et al. (1987) provaram ser a maltose a melhor fonte de carbono.

Dentre os trabalhos desenvolvidos para indução de esporulação em fungos que produzem limitado número de esporos em meios de cultura artificiais, destacam-se aqueles cujos resultados foram promissores através da utilização de substratos naturais. Malleswara Rao & Narayana Rao (1981) recomendam o uso de folhas destacadas ou extrato de folhas de *Commelina benghalensis*, para estimulação de esporos de *Pyricularia* spp.. Steiner (1974) conseguiu esporulação de *Colletotrichum coffearum* Noack sobre frutos de *Coffea arabica*, quatro a seis dias após crescimento do fungo. Desse modo, o uso de substratos naturais, além de bastante eficiente para propiciar elevada produção de esporos e reativar este processo, é de fácil preparo e de uso mais simples em trabalhos laboratoriais rotineiros (Soave et al. 1975).

REFERÊNCIAS

- AHMED, K.M. Effect of temperature and light on the growth and sporulation of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Bangladesh Journal of Botany*, v.14, n.2, p.155-160, 1985.
- MALLESWARA RAO, Y.; NARAYANA RAO, A. Sporulation of *Pyricularia* spp: stimulation by detached leaves and leaf extracts of *Commelina benghalensis*. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences Plant Science*, v.90, n.5, p.389-399, 1981.
- RAJAK, R.C. Nutritional requirements of 2 spp of *Colletotrichum*. *Acta Botanica Indica*, v.11, n.2, p.155-160, 1983.
- ROY, A.K. Effect of nitrate nitrogen on growth and sporulation of *Colletotrichum dematium* (Pers. ex Fr.) Grov. *Journal of the Indian Botanical Society*, v.56, n.4, p.278-280, 1977.
- SHUKLA, D.S. Studies on the growth and sporulation of *Colletotrichum gloeosporioides* in relation to vitamins. *Indian Phytopathology*, v.25, n.2, p.300-302, 1972.
- SINGH, D.; SHARMA, B.M.; KAUSHAL, S.C. Studies on growth requirements and sporulation of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. isolated from *Citrus sinensis* (L.). *Osbeck Research Bulletin Panjab Univ. Science*, v.38, n.1/2, p.83-86, 1987.
- SINGH, R.D.; GARRAWAY, M.O. Role of trace elements in the growth and sporulation of *Colletotrichum lagenarium*. *Indian Phytopathology*, v.28, n.4, p.468-475, 1975.
- SOAVE, J.; GALLI, F.; KIMATI, H. Estudo do crescimento vegetativo e da esporulação de *Pyricularia oryzae* Cavara, em diferentes meios de cultura. *Summa Phytopathologia*, v.1, p.187-197, 1975.
- STEINER, K.G. Die Sporulation von *Colletotrichum coffeanum* Noack auf Kurschen von *Coffea arabica* L. *Phytopathologische Zeitschrift*, v.79, n.2, p.179-189, 1974.
- WEITZMAN, I.; SILVA-HUTNER, M. Non-keratinous agar media as substrates for the ascigenous state in certain members of the Gymnoascaceae pathogenic for man and animals. *Sabouraudia*, v.5, p.335-340, 1967.
- WINDELS, C.E.; BURNES, P.M.; KOMMEDAHL, T. Five-year preservation of *Fusarium* species on silica gel and soil. *Phytopathology*, v.78, n.1, p.107-109, 1988.