

## Influência de fontes de carbono e nitrogênio, pH e qualidade da luz no crescimento micelial, esporulação e peso seco de *Fusarium moniliforme*

Tereza Cristina de ASSIS<sup>1</sup>; Albaneyde Leite LOPES<sup>1</sup>; Domingos Eduardo G.T. ANDRADE<sup>2</sup>; Maria MENEZES<sup>3</sup>; Denise Maria Wanderley SILVA-HANLIN<sup>4</sup>

**RESUMO:** Estudou-se a influência de fontes de carbono (sacarose, dextrose e amido) e nitrogênio (asparagina, peptona, nitrato de potássio e nitrato de sódio), pH (5,5 e 6,5) e qualidade da luz (branca, verde, azul e vermelha) no crescimento micelial, esporulação e peso seco de *Fusarium moniliforme*. Após dez dias de incubação, constatou-se maior crescimento micelial do fungo induzido por amido e nitrato de sódio, diferindo significativamente das demais fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. O pH 5,5 proporcionou o maior crescimento micelial, enquanto não se verificou influência da qualidade da luz nesta variável estudada. Nenhuma das fontes de carbono e nitrogênio, pH e qualidade da luz induziram a esporulação do fungo. O maior peso seco (103mg) foi proporcionado pela combinação amido e nitrato de potássio. Os resultados evidenciaram que as fontes de carbono e nitrogênio influenciaram significativamente no crescimento micelial e no peso seco de *Fusarium moniliforme*.

Palavras chave: *Fusarium moniliforme*, fontes de carbono, fontes de nitrogênio, pH, qualidade da luz, crescimento micelial, esporulação, peso seco.

### INTRODUÇÃO

*Fusarium moniliforme* é agente etiológico de várias doenças em diferentes culturas, dentre elas destacam-se a podridão da espiga e colmo do milho (Reis & Casa, 1996), podridão do colmo e pokkah-boeng em cana-de-açúcar (Tokeshi, 1997) e a podridão vermelha do colmo em sorgo (Panizzi & Fernandes, 1997). Este fungo ocorre também em sementes, sendo um dos principais fatores para a redução da porcentagem de germinação de sementes de milho (Camargo, 1998).

A espécie *F. moniliforme* [Teliomorfo: *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Ito & Kimura] pertence a divisão Amastigomycota, classe Deuteromycetes, ordem Moniliales e família Tuberculariaceae. Apresenta conídios fusoides, hialinos, unicelulares, produzidos em cadeias, com tamanho variando de 5-12µm x 1,5-2,5µm e, ocasionalmente, formando septo. A formação de macroconídios é rara, quando presentes, são formados como ramificações laterais das hifas. Os macroconídios (3-7 septos) apresentam a célula basal pedicelada e a apical curvada, com tamanho variando de 25-60µm x 2,5-4µm, não formam clamidosporos (Alexopoulos & Mims, 1979; Menezes & Oliveira, 1993).

O desenvolvimento fúngico é influenciado por vários fatores nutricionais e ambientais, como fontes de nutrientes, relação carbono/nitrogênio, potencial solúvel do meio, luminosidade, umidade, aeração e pH (Cochrane, 1958). Geralmente, a esporulação é favorecida por condições nutricionais adversas ao crescimento vegetativo, assim como, condições ambientais favoráveis para o crescimento vegetativo podem ser inadequadas a esporulação, ou seja, não existem condições universais para o crescimento e esporulação de fitopatógenos (Pea *et al.*, 1997). Portanto, estudos envolvendo técnicas de produção de propágulos vegetativos, assexuais ou sexuais são importantes por propiciarem informações consistentes sobre o

cultivo de fungos (Lilly & Barnett, 1951).

Este trabalho teve por objetivo avaliar a influência de fontes de carbono e nitrogênio, pH e qualidade da luz no crescimento micelial, esporulação e peso seco de *F. moniliforme*.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Fitopatógeno

Utilizou-se um isolado do fungo *F. moniliforme* proveniente da Micoteca do Laboratório de Micologia pertencente à Área de Fitossanidade, do Departamento de Agronomia, da Universidade Federal Rural e Pernambuco.

#### Influência de fontes de carbono e nitrogênio

No estudo da influência de nutrientes sobre *F. moniliforme* foi utilizado meio basal (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1g; MgSO<sub>4</sub>, 0,5g; Ágar, 17g e água destilada, 1000mL) (Lilly & Barnett, 1951) com a adição de fontes de carbono (sacarose, dextrose e amido) e nitrogênio (peptona, asparagina, nitrato de sódio e nitrato de potássio), na proporção de 10:1, respectivamente.

O fungo foi cultivado inicialmente em BDA (batata, 200g; dextrose, 20g; ágar, 17g e água destilada, 1000mL) durante oito dias, à temperatura de 25±3°C, umidade relativa de 60±7%, em claro contínuo. Na avaliação do crescimento micelial e esporulação de *F. moniliforme*, discos de meio de cultura apresentando estruturas do fungo foram transferidos para o centro de placas de Petri, contendo meio basal sólido com as combinações de carbono e nitrogênio, enquanto, para a avaliação do peso seco, os discos foram transferidos para Erlenmeyers, contendo meio basal líquido (sem adição de ágar) e as combinações de nutrientes testadas.

A incubação foi realizada durante 10 dias, à temperatura de 25±3°C, umidade relativa de 50±5%, em claro contínuo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3x4 (3 fontes de carbono e 4

<sup>1</sup>Bolsista da CAPES

<sup>2</sup>Bolsista do CNPq

<sup>3</sup>Prof. Adjunto do Depto. de Agronomia da UFRPE

<sup>4</sup>Doutora em Fitopatologia da UFRPE

fontes de nitrogênio), com 12 tratamentos e três repetições.

A avaliação do crescimento micelial consistiu na medição diária do diâmetro da colônia, em dois sentidos diametralmente opostos, com régua milimetrada, obtendo-se a média para cada repetição. As avaliações foram realizadas até que o fungo atingisse o diâmetro completo da placa em qualquer repetição ou tratamento. Com os dados obtidos, as médias do último dia de avaliação foram comparadas estatisticamente e elaborou-se as curvas de crescimento de *F. moniliforme*.

Após a última leitura do crescimento micelial foi estimada a esporulação de *F. moniliforme* com o auxílio de uma câmara de Neubauer. As suspensões foram preparadas pela adição de 20mL de água destilada esterilizada a cada placa, em seguida, efetuou-se a raspagem da colônia utilizando escovas de cerdas macias e a filtragem em camada de gaze dupla.

Para determinação do peso seco, ao final de 216 horas de incubação, o meio contendo o crescimento fúngico foi filtrado em tecido de nylon e a massa micelial retida na malha, colocada em recipiente de alumínio previamente tarado. O material foi mantido em estufa a 40°C, durante 72 horas, após o qual procedeu-se a pesagem.

#### Influência do pH e qualidade da luz

Na avaliação da influência do pH e de qualidade da luz foi utilizado o meio basal (Lilly & Barnett, 1951) com a combinação de amido (fonte de carbono) e nitrato de sódio (fonte de nitrogênio) na proporção de 10:1, respectivamente.

Foram estudados dois pH (5,5 e 6,5) no meio basal, sendo ajustados com o auxílio de um pH-metro. Enquanto, no estudo da qualidade da luz, as placas foram envolvidas em papel celofane verde (610Lx), vermelho (297Lx), azul (841Lx) e transparente (1155Lx), sendo a intensidade luminosa determinada por um luxímetro.

O fungo foi cultivado e inoculado, conforme descrito anteriormente. A incubação das placas foi realizada em condições normais de laboratório, sob regime de alternância luminosa (claro e escuro). Ao final de 216 horas de incubação foram determinados o crescimento micelial e a esporulação de *F. moniliforme*, conforme descrito anteriormente.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 4x2 (qualidade de luz x pH), com oito tratamentos e três repetições.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Influência de fontes de carbono e nitrogênio

As curvas de crescimento nas diferentes combinações de fontes de carbono e nitrogênio

demonstraram uniformidade no crescimento micelial de *F. moniliforme* (Figura 1). No entanto, ocorreram diferenças significativas no crescimento micelial deste fungo, como constatado com a análise dos dados do último dia de avaliação (Tabela 1).

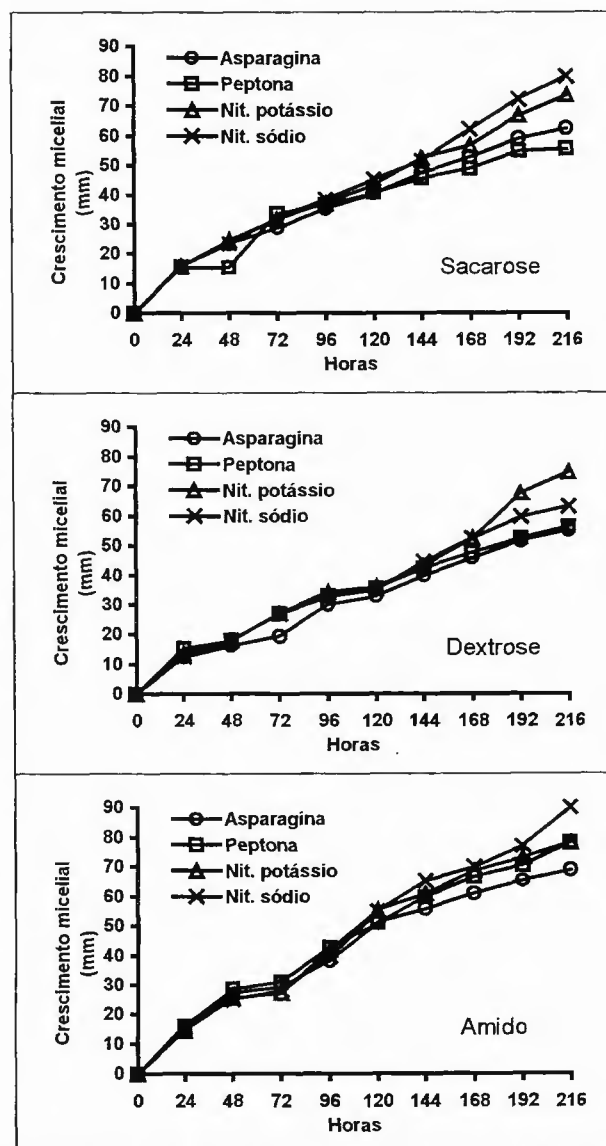


Figura 1- Efeito de fontes de nitrogênio combinadas com fontes de carbono, em meio sólido, no crescimento micelial de *Fusarium moniliforme*.

Em termos gerais, analisando-se independentemente as fontes de carbono e nitrogênio, verificou-se que o amido (79,1mm) foi a melhor fonte de carbono, proporcionando o maior crescimento micelial de *F. moniliforme*, que diferiu significativamente dos demais. Em relação as fontes de nitrogênio, o nitrato de sódio (77,5mm) e de potássio (75,4mm) destacaram-se por propiciar maior crescimento micelial, diferindo significativamente das demais fontes nitrogenadas (Tabela 1).

A combinação amido x nitrato de sódio

(90,0mm) destacou-se das demais por propiciar crescimento micelial em toda a superfície do meio, seguida das combinações sacarose x nitrato de sódio (79,8mm), amido x peptona (79,7mm) e amido x nitrato de potássio (78,0mm) (Tabela 1).

Tabela 1 - Crescimento micelial (mm) de *Fusarium moniliforme* em diferentes fontes de carbono e nitrogênio, após dez dias de incubação

Fonte de Nitrogênio	Fontes de Carbono			Média
	Dextrose	Amido	Sacarose	
Pep	56,2 b B <sup>1</sup>	79,7 ab A	55,5 c B	63,8 b
Asp	55,0 b B	68,8 b A	62,3 bc AB	62,1 b
KNO <sub>3</sub>	74,7 a A	78,0 ab A	73,5 ab A	75,4 a
NaNO <sub>3</sub>	63,0 ab B	90,0 a A	79,8 a A	77,6 a
Média	62,2 B	79,1 B	67,8 B	

CV(%) = 8,73

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tkey (P>0,05). Pep=peptona; Asp=asparagina; KNO<sub>3</sub>=nitrato de potássio; NaNO<sub>3</sub>=nitrato de sódio.

Neste estudo verificou-se que o amido foi a melhor fonte de carbono para o crescimento de *F. moniliforme*, no entanto, os fungos podem utilizar uma grande variedade de fontes de carbono, dentro de monossacarídeos, dissacarídeos, polissacarídeos, ácidos orgânicos e lipídios, dependendo do sistema enzimático para clivagem das cadeias desses carboidratos (Robinson, 1978; Harder & Dijkhuizen, 1983; Griffin, 1994).

A melhor resposta no crescimento micelial do fungo foi induzida pelo nitrogênio na forma inorgânica (nitrato), em contraposição às formas orgânicas (peptona e asparagina). Isto indica que o fungo estudado comportou-se de maneira diferente ao esperado, uma vez que a disponibilidade do nitrogênio nas formas orgânicas é bem maior que nas inorgânicas (Hawker, 1950). Entretanto, segundo Lilly & Barnett (1951) e Cochrane (1958), os nitratos são excelentes fontes de nitrogênio para vários fungos.

Nenhuma das diferentes combinações de fontes de carbono e nitrogênio utilizadas induziram a esporulação de *F. moniliforme*. Apesar da combinação amido x nitrato de sódio ter proporcionado o maior crescimento micelial, esta não promoveu a esporulação de *F. moniliforme*. Sabe-se que, nem sempre o meio que induz um bom crescimento micelial, favorece igualmente a esporulação do fungo (Griffin, 1994).

Em face a estes resultados, outras concentrações de carbono e nitrogênio associadas a temperatura devem ser testadas para promover a esporulação de *F. moniliforme*, uma vez que, os fatores que interferem de forma positiva ou negativa na esporulação dos fungos, são de grande importância (Hawker, 1966).

Foram observadas variações no peso seco de *F. moniliforme* em relação as diferentes combinações de fontes de carbono e nitrogênio

(Tabela 2). Em termos gerais, o amido (77mg) e os nitratos de potássio (62mg) e sódio (54mg) propiciaram crescimento significativamente superior as demais fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente.

Tabela 2 - Peso seco (mg) de *Fusarium moniliforme* em diferentes fontes de carbono e nitrogênio, após dez dias de incubação

Fonte de Nitrogênio	Fontes de Carbono			Média
	Dextrose	Amido	Sacarose	
Pep	23,0 b B <sup>1</sup>	43,0 c A	40,0 a A	35,0 b
Asp	26,0 ab B	80,0 b A	53,0 a B	53,0 b
KNO <sub>3</sub>	30,0 ab A	103,0 a A	53,0 a B	62,0 a
NaNO <sub>3</sub>	40,0 a B	80,0 b A	43,0 a B	54,0 a
Média	30,0 C	77,0 A	47,0 B	

CV(%) = 14,13

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tkey (P>0,05). Pep=peptona; Asp=asparagina; KNO<sub>3</sub>=nitrato de potássio; NaNO<sub>3</sub>=nitrato de sódio.

As combinações de amido com nitrato de potássio (103mg), nitrato de sódio (80mg) e asparagina (80mg) induziram o maior peso seco de *F. moniliforme*, semelhante ao relatado por vários autores (Hawker, 1950; Cochrane, 1958; Olufolaji, 1984)

O amido foi a fonte de carbono que induziu o maior peso seco de *F. moniliforme*, tal fato sugere a capacidade de produção de enzimas hidrolíticas, pelo fungo, semelhante ao observado por outros autores (Taber *et al.*, 1968; Hasifa, 1970). Os açúcares, como a sacarose possivelmente não foi bem decomposta por *F. moniliforme*, pois não propiciaram um bom desenvolvimento do fungo. Segundo Moorelandecker (1972) e Burnett (1976), geralmente, a incapacidade de absorver um açúcar complexo é devido a falhas em hidrolizar este açúcar, já que este exige do fungo um gasto adicional de energia, para a síntese de enzimas. Os nitratos proporcionaram o maior peso seco do fungo, indicando uma melhor utilização na síntese de protoplasma, conforme relatado por Lilly & Barnett (1951) e Cochrane (1958).

#### Influência do pH e qualidade da luz

Foram detectadas diferenças significativas no crescimento micelial de *F. moniliforme*, em relação aos dois tipos de pH testados, sem no entanto sofrerem influência da qualidade da luz utilizada (Tabela 3).

Tabela 3 – Crescimento micelial (mm) de *Fusarium moniliforme* sob diferentes pH e qualidade de luz, após dez dias de incubação

pH	Qualidade de luz				Média
	Branca	Verde	Azul	Vermelha	
5,5	90,0 a A	90,0 a A	90,0 a A	90,0 a A	90,0 a
6,5	76,8 b A	76,5 b A	70,7 b A	72,2 b A	74,1 b
Média	83,4 A	83,3 A	80,3 A	81,1 A	

CV(%) = 4,97

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P>0,05)

No pH 5,5 constatou-se o máximo crescimento de *F. moniliforme* (90,0mm) em todas as repetições, independente do tipo de luz utilizada. Entretanto, quando se utilizou pH 6,5 o fungo apresentou um menor crescimento micelial, em todas as combinações de luz, porém sem haver diferença significativa (Tabela 3). De maneira similar, Reis *et al.* (1997) trabalhando com *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli*, verificaram não haver influência do fator luz sobre o crescimento do fungo. Geralmente, a luz apresenta pouco efeito sobre o crescimento micelial, na maioria dos fungos (Hawker, 1957 e 1966).

Também, não se observou esporulação de *F. moniliforme* em nenhuma das interações de pH e qualidade de luz. No entanto, Reis *et al.* (1997), trabalhando com *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* verificou que esta espécie esporulou sob a influência do tipo de luz utilizada. Segundo Minusi *et al.* (1977) a qualidade e intensidade da luz afeta a taxa de crescimento e induz a formação de estruturas reprodutivas. Entretanto, nenhuma das variáveis analisadas induziu a esporulação de *F. moniliforme*.

## ABSTRACT

### Influence of sources of carbon and nitrogen, pH, light quality on mycelial growth, sporulation, and dry weight of *Fusarium moniliforme*

The influence of sources of carbon (sucrose, dextrose, and starch) and nitrogen (asparagin, peptone, potassium nitrate, and sodium nitrate), pH (5.5 and 6.5) and light qualities (white, green, blue, and red) in the micelial growth, sporulation and dry weight of *Fusarium moniliforme* was studied. Ten days after incubation period, higher micelial growth of the fungus was induced by starch and sodium nitrate, differing significantly from the other sources of carbon and nitrogen, respectively. The pH 5.5 provided the highest micelial growth, whereas the influence of the light quality in this variable was not observed. None of the carbon and nitrogen sources, pH and light quality induced sporulation. The highest dry weight was provided by the starch and potassium nitrate combination. The results showed that the carbon and nitrogen sources influenced significantly the micelial growth and the dry weight of *Fusarium moniliforme*.

Key words: *Fusarium moniliforme*, carbono sources, nitrogen sources, pH, light quality, micelial growth, sporulation, dry weight

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1  
ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. *Introductory mycology*. 3rd Ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. 868 p.

2  
BURNETT, J.H. *Fundamental of micology*. London: Edward Arnold Ltd, 1976. 673p.

3  
CAMARGO, T.V. Diversidade fúngica e caracterização patogênica, morfológica e isoenzimática de três espécies de *Fusarium*, oriundos de sementes de milho (*Zea mays* L.). Recife, 1998. 102p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1998.

4  
COCHRANE, V.W. *Physiology of fungi*. New York: John Wiley & Sons Inc., 1958. 542p.

5  
GRIFFIN, D.H. *Fungal physiology*. 2.ed. New York: John Wiley & Sons, 1994. 645p.

6  
HARDER, W.; DIJKHUIZEN, I. Physiological responses to nutrient limitation. *Annales de Microbiologie*, Paris, v.37, p.1-23, 1983.

7  
HASIFA, S.K. Physiological studies of *Alternaria citri* and *A. tenuis*. *Mycologia*, Bronx, v.62, p.289-95, 1970.

8  
HAWKER, L.E. *Physiology of fungi*. London: University of London, 1950, 360p.

9  
HAWKER, L.E. *The physiology of reproduction in fungi*, Cambridge: Cambridge University Press, 1957. 128p.

10  
HAWKER, L.E. Environmental influence on reproduction. In: AINSWORTH, G.C.; SUSSMAN, A.S. (Ed.) *The fungi*, New York: Academic Press, 1966. v.2, p.435-469.

11  
LILLY, V.G.; BARNETT, H.L. *Physiology of the fungi*. New York: Mc Gram-Hill Book, 1951. 464p.

12  
MENEZES, M.; OLIVEIRA, S.M.A. *Fungos fitopatogênicos*. Recife: UFRPE, 1993. 277p.

13  
MINUSSI, E.; MACHADO, C.G.; MENTEN, J.O.M. 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, 1979.

14  
MOORE-LANDECKER, E. *Fundamentals of the fungi*. New Jersey: Prentice Hall, 1972. 482p.

15  
OLUFOLAJI, D.B. Sporulation and growth of *Curvularia pallescens* as affected by media, temperature and nitrogen source. *Phytopathology*, St. Paul, v.74, n.3, p.260-3, 1984.

16  
PANIZZI, R.C.; FERNANDES, N.G. Doenças do sorgo. In: KIMATI, H. et al. (Ed.) *Manual de fitopatologia*. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v.2, pp.676-689.

17  
PEA, M.D.; BERMAIN FILHO, A.; AMORIN, L. Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Phaeoisariopsis griseola* e *Alternaria* sp. *Summa phytopathologica*, Piracicaba, v.23, n.2, p.181-183, 1997.

18  
REIS, E.M.; CASA, R.T. *Manual de identificação e controle de doenças de milho*. Passo Fundo: Aldeia Norte Editora, 1996. 78p.

19  
REIS, A.; SOUZA, R.C.; MENEZES, M. Efeito de meios de cultura e qualidades de luz sobre o crescimento micelial e esporulação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. *Revista Ômega*, Recife, n.10, p.45-48, 1997.

20  
ROBINSON, P.M. *Practical fungal physiology*. Chichester: John Wiley & Sons, 1978. 123p.

21

TABER, R.A.; VANTERPOOL, T.C.; TABER, W.A. A comparative nutritional study of *Alternaria raphany*, *A. brassicae* and *A. brassicicola* with special reference to *A. raphany*. **Phytopathology**, v.58, n.5, p.609-16, 1968.

22

TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H. et al. (Ed.) **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1997. v.2, pp.207-225.