

## INFLUÊNCIA DE MEIOS DE CULTURA, FOTOPERÍODO E pH NO CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DE *Phytophthora nicotianae*

**Antônio Alves Pimenta Neto<sup>1,2</sup>, Edna Dora Martins Newman Luz<sup>2</sup>, Gláucio Dias Gonçalves<sup>3</sup>,  
Sônia Maria Alves de Oliveira<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia (PPGF)/ Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil, pimenta\_dm@yahoo.com.br, s.oliveira@depa.ufrpe.br; <sup>2</sup>Centro de Pesquisas do Cacau (Cepec)/Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (Ceplac), Rod. Ilhéus-Itabuna, km 22, 45662-000, Ilhéus, BA, Brasil, ednadora@yahoo.com.br; <sup>3</sup>Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Rod. Ilhéus/Itabuna, km 16, 45662-900, Ilhéus, BA, Brasil, glauciogdg@yahoo.com.br.

O comportamento de dois isolados *Phytophthora nicotianae* foi avaliado em meios de cultura agarisados e líquidos de cenoura (c), tomate (t), berinjela (b), feijão (f), soja (s), mandioca (m) e suco de vegetais (V8), submetidos à luz (L), escuro (E) e fotoperíodo de 12h (LE), à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . O pH inicial dos meios e após ajuste para 4,8 foi correlacionado com o crescimento e esporulação nos meios líquidos. Foi avaliada a evolução radial diária do micélio e a biomassa produzida após 10 e 15 dias de incubação. A esporulação foi ponderada no 10º e 15º dia em câmara de Neubauer. Nos meios agarisados, (E) proporcionou os maiores crescimentos, entretanto em todos os regimes de luz os meios se diferenciaram, destacando-se dos demais os de (m), (b), (t), e (V8) os dois primeiros com os maiores crescimentos e os dois últimos com os menores. Os regimes de luz não influenciaram o crescimento nos meios líquidos com 10 dias de incubação. Já com 15 dias, o crescimento nos meios (b) (c) (t) e (V8) foi inversamente proporcional à presença de luz, que é um fator essencial para a esporulação. Verificou-se que meios mais ácidos proporcionam um menor crescimento, mas uma maior esporulação para *P. nicotianae*.

**Palavras-chave:** oomicetos, zoosporogênese, comportamento fisiológico.

**Influence of culture media, photoperiod and pH on growth and sporulation of *Phytophthora nicotianae*.** The behavior of two *Phytophthora nicotianae* isolates was evaluated in agar and liquid culture media of carrot (c), tomato (t), eggplant (b), soybean (s), cassava (m) and vegetable juice (V8), submitted to light (L), dark (E) and photoperiod of 12h (LE) at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . The initial pH of the media and after adjustment to 4.8 was correlated with growth and sporulation in the liquid media. The daily radial evolution of mycelium and biomass produced after 10 and 15 days of incubation were evaluated. Sporulation was weighted on the 10th and 15th day in Neubauer chamber. In the agar media, (E) provided the highest growth, however in all light regimes the media differed, standing out from the others were the ones of (m), (b), (t), and (V8). The first two with the highest growths and the last two with the lowest. Light regimes did not influence growth in liquid media with 10 days of incubation. At 15 days, growth in media (b) (c) (t) and (V8) was inversely proportional to the presence of light, but light is an essential factor for sporulation. It has been found that more acidic media provide lower growth, but greater sporulation for *P. nicotianae*.

**Key words:** oomycetes, zoosporogenesis, physiological behavior.

## Introdução

Dentre os fitopatógenos habitantes do solo, um grupo em especial possui merecido destaque em razão do seu efeito destrutivo em plantas hospedeiras, caráter polífago e cosmopolita. Espécies de *Phytophthora* podem estar associadas a diversos órgãos vegetais como folhas, troncos, hastes, almofadas florais, frutos em qualquer estádio de amadurecimento, e principalmente a raízes, ocasionando sintomas típicos de podridões radiculares e tombamento (Luz et al., 2001).

No Brasil, *Phytophthora nicotianae* Breda de Hann é relatada como a espécie do gênero que possui a maior gama de hospedeiros, sendo patogênica a mais de 31 espécies vegetais (Luz, 2006), incluindo plantas aromáticas, ornamentais, medicinais, espécies florestais, e cultivos agrícolas perenes e anuais de grande importância econômica. Apesar desta espécie estar associada a inúmeras plantas incitando doenças, a dificuldade em conseguir isolados esporulantes, ou mesmo padronizar condições ideais para a esporulação, é um dos principais problemas para o estudo da patogênese a estes hospedeiros.

A esporulação é um processo de diferenciação mais específico, no qual, estão envolvidas as células reprodutivas afetadas por modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (Griffin, 1993). A luminosidade exerce efeito direto sobre a célula fúngica, induzindo ou inibindo a formação de estruturas de reprodução, embora haja algumas espécies que são indiferentes à quantidade e/ou qualidade da luz (Hawker, 1957). A maioria dos fungos sensíveis à luz esporula quando expostos à luz contínua, mas alguns, chamados de esporuladores diurnos, requerem a alternância de luminosidade (Dhingra; Sinclair, 1995). A necessidade de luz para o crescimento e esporulação de fungos é tão variável, que pode ocorrer até mesmo entre isolados da mesma espécie (Masangkay et al., 2000). Alguns esporulam melhor na presença de luz contínua ou em escuro contínuo (Cooperman; Jenkins, 1986).

Assim como a qualidade e intensidade luminosa (Pulz; Massola Jr., 2009), a composição do meio de cultura e a temperatura determinam a quantidade e qualidade do crescimento micelial e esporulação dos fitopatógenos (Dhingra; Sinclair, 1995).

Esporângios e zoósporos são as principais estruturas responsáveis pela disseminação, infecção e desenvolvimento das doenças causadas por *Phytophthora* (Luz; Matsuoka, 2001), entretanto a obtenção dessas estruturas nem sempre é alcançada nos meios de cultura convencionais (Abdanur et al., 2003).

Os fungos e os oomicotas requerem uma variedade de elementos químicos para se desenvolverem, portanto para o cultivo em laboratório, é necessário que os meios de cultura simulem ou até mesmo melhorem as condições naturais (Pelczar et al., 1996). Vários meios de cultura foram desenvolvidos para atender as exigências nutricionais das diferentes espécies de fungos encontrados na natureza, podendo ser sintéticos, semissintéticos ou naturais (Menezes; Assis, 2004).

Estudos visando testar meios e métodos de produção de esporângios e liberação dos zoósporos “*in vitro*”, incluindo a ação de outros fatores fisiológicos, contribuirão para facilitar os testes de patogenicidade com *P. nicotianae*, tornando-os mais apropriados à realidade do campo, bem como aqueles que visam o controle da doença. Com estas perspectivas, o objetivo do presente estudo foi fornecer informações sobre os efeitos de diferentes meios de cultura, luminosidade, e pH no crescimento micelial, e padrões de esporulação de isolados de *P. nicotianae*.

## Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de *Phytophthora* do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), da Comissão Executiva da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), Ilhéus, Bahia, Brasil.

### Obtenção dos isolados

Foram utilizados dois isolados de *P. nicotianae* (1365 e 1405) obtidos de tecido vegetal infectado e solos cultivados com hospedeiros, pertencentes a Coleção Brasileira de *Phytophthora* “Arnaldo Gomes Medeiros” (CEPEC-CEPLAC). Para a obtenção de culturas novas e patogenicamente viáveis, os isolados foram inoculados em frutos de berinjela (*Solanum melongena* L.) e reisolados segundo metodologia de Luz et al. (2008).

### Influência de diferentes meios de cultura

Sete diferentes substratos foram escolhidos para a composição dos meios de cultura com base na literatura existente e/ou suscetibilidade da espécie vegetal a *P. nicotianae*: sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) (f), sementes de soja (*Glycine max* L.) (s), frutos de berinjela (b) e de tomate (t), raízes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (m) além de suco de vegetais - V8 (Campbell Soup Company) (V8), e raízes de cenoura (*Daucus carota* L.) (c). A exceção do V8, os substratos foram submetidos à fervura por 15min em microondas com água destilada, triturados em liquidificador e filtrados em quatro camadas de gaze, de modo a obter meios líquidos (200 g do substrato; 800 mL de água destilada) e meios agarisados (200 g do substrato; 800 mL de água destilada; 14 g de ágar). Após o preparo, os meios foram autoclavados a 121°C por 20 minutos e vertidos assepticamente em placas de Petri. Discos de 0,9 mm de diâmetro foram retirados dos bordos das colônias dos isolados, cultivados por sete dias em cenoura-ágar (CA), e transferidos para o centro de placas de Petri com os meios supracitados.

### Influência do fotoperíodo

Os isolados cresceram sob três condições de luminosidade: luz constante (L), fotoperíodo de 12h (LE), e ausência de luz (E). Na iluminação contínua, três lâmpadas fluorescentes (General Electric, 40 Watts, luz do dia), foram posicionadas a cerca de 50 cm acima das placas (2000 lux), expondo-as aos raios luminosos. No regime de alternância luminosa, as placas foram incubadas em BOD com temperaturas ajustadas para 25°C e 12h de fotoperíodo. A ausência de iluminação foi obtida pelo acondicionamento das placas em caixas plásticas foscas. O ensaio foi conduzido em ambiente do laboratório, com temperatura mantida em 25±2°C e monitorada com aparelhos data logger HOBO®.

### Avaliação do crescimento e esporulação

O crescimento radial das colônias formadas em meios agarisados foi avaliado diariamente com paquímetro, em dois sentidos diametralmente opostos das colônias para a obtenção da média, e cálculo da

taxa de crescimento ao longo de seis dias. Em meios líquidos, avaliou-se o peso seco da biomassa produzida após 10 e 15 dias de incubação, com cinco repetições/tratamento. A esporulação nos diferentes meios, líquidos e agarisados, foi avaliada aos 10 e 15 dias de incubação, quantificando os zoósporos em câmara de Neubauer em cinco repetições por tratamento. Nos meios líquidos, após o 9º e o 14º dia de incubação, foi escorrido o excesso dos meios de cultura, o micélio lavado com água destilada esterilizada (ADE) e incubado novamente sob as mesmas condições que se encontrava por 24h. A obtenção da suspensão de zoósporos, seja nos meios líquidos ou sólidos seguiu metodologia proposta por Luz et al. (2008).

### Influência do pH

Após a confecção dos meios de cultura foi aferido o pH inicial, e os valores correlacionados com o crescimento e esporulação. A influência do pH na esporulação também foi avaliada através do número de zoósporos produzidos após submissão da massa micelial formada nos diferentes meios líquidos ao 14º dia, em soluções salinas (NaCl e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) com pH ajustado para 4,8, por 48h. Os valores de pH foram aferidos a partir de amostras de 15 mL de cada meio de cultura, com potenciômetro previamente calibrado por soluções tampão pH 4,0 e 7,0.

### Análises dos dados

O comportamento dos dois isolados de *P. nicotianae* foi avaliado após 10 e 15 dias de incubação através de esquema fatorial 7x3 (meios de cultura x luminosidade), totalizando 21 tratamentos com 5 repetições cada. O crescimento micelial nos meios sólidos foi mensurado até a maioria das colônias atingirem os bordos das placas (seis dias de cultivo). Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. O crescimento micelial, taxas de crescimento em meios agarisados, e biomassa e esporulação após transformação ( $\sqrt{x+1}$ ) foram submetidas à análise de variância pelo teste F ( $p = 0,01$ ), e comparadas pelo teste de Tukey ( $p = 0,05$ ). A biomassa e a esporulação produzida pelos isolados ao 15º dia de incubação foram correlacionadas, através do coeficiente de Pearson. As análises foram

realizadas utilizando a versão 9 do software SAS® - Statistical Analysis System (SAS, 2004).

## Resultados e Discussão

Os isolados 1365 e 1405 se comportaram de forma análoga, não diferindo significativamente ao apresentar crescimento vegetativo semelhante nos diferentes meios agarisados ou líquidos, permitindo que fosse usada a média de crescimento dos dois isolados para avaliação do efeito dos meios e regimes de luminosidade.

Houve efeito do regime de luminosidade no crescimento dos isolados em diferentes meios de cultura. No geral, a exceção dos meios de cenoura e mandioca, a ausência da luz (E) durante todo o tempo de cultivo e alternância luminosa de 12h (L/E) proporcionou uma rápida evolução do diâmetro médio das colônias comparado aos tratamentos com luz constante (E) (Tabela 1). Destacaram-se os grupos formados pelos meios a base de mandioca (m) e berinjela (b), e tomate (t) e suco de vegetais (V8), evidenciando sempre os maiores crescimentos nos dois primeiros e, nos dois últimos, os menores. Apesar da menor taxa de crescimento micelial entre o terceiro e o sexto dia de incubação, ter sido evidenciada em (m), este meio induziu a formação das maiores colônias em todas as condições. Os regimes de luz pouco influenciaram o crescimento dos isolados no meio (s), não havendo diferenças significativas em relação às

variáveis analisadas. O efeito dos regimes de luz foi mais acentuado quando os isolados foram cultivados em (V8), manifestando-se desde os primeiros dias de avaliação do crescimento. A taxa de crescimento e o tamanho da colônia ao sexto dia de incubação demonstram a diferença na evolução das colônias nos regimes (LE), (E), (L), que proporcionaram, nestes meios, em ordem decrescente, os maiores crescimentos.

Comparando-se a biomassa seca produzida pelos isolados com 10 e 15 dias de cultivo, na maioria dos meios líquidos avaliados observa-se que não houve um aumento significativo da biomassa no intervalo de cinco dias de cultivo, sendo, portanto, apresentados somente os dados referentes à 15 dias de cultivo. Assim como nos meios agarisados, os meios e regimes de luz influenciaram significativamente o comportamento dos isolados. A presença de luz retardou o desenvolvimento das colônias na maioria dos meios, tendo como exceções o meio (m) por não haver diferença da biomassa produzida nos três regimes de luz, e (s) por proporcionar o maior desenvolvimento da colônia em alternância luminosa de 12h. A maior produção de biomassa ocorreu quando os isolados foram cultivados em (m), e as menores em (t) e (V8).

O meio de (m) influenciou positivamente o crescimento dos isolados testados, ao proporcionar os maiores crescimentos em todos os tratamentos, nos meios líquidos ou agarisados. Dentre os meios testados, (m) é o mais rico em carbono por ser composto

Tabela 1. Crescimento micelial de isolados (1365 e 1405) de *Phytophthora nicotianae* em diferentes meios de cultura, agarisados e líquidos, sob diferentes regimes de luz, à 25±2°C

Meios <sup>1</sup>	Diâmetro médio da colônia						Biomassa <sup>4</sup> (g)		
	TCM <sup>2</sup> (cm.dia <sup>-1</sup> )			CM6 <sup>3</sup> (cm)					
	E <sup>5</sup>	LE <sup>6</sup>	L <sup>7</sup>	E	LE	L	E	LE	L
B	1,42 aA	1,32 aA	1,14 bB	9,49 aA	9,50 aA	9,07 aB	0,076 cdA	0,041 dB	0,022 eC
C	1,15 cB	1,31 aA	1,34 aA	9,39 aA	9,47 aA	8,87 aB	0,134 cA	0,100 cdB	0,104 cB
F	1,26 bA	1,24 aA	1,15 bB	9,00 bA	8,41 bB	8,52 bB	0,161 bA	0,155 cbAB	0,096 cdB
M	0,87 dC	1,29 aA	1,16 bB	9,50 aA	9,48 aA	9,18 aA	0,397 aA	0,386 aA	0,362 aA
S	1,09 cA	1,13 bA	1,03 bcA	7,95 cA	8,00 cA	8,15 cA	0,173 bB	0,210 bA	0,165 bB
T	1,27 bA	1,30 aA	1,14 bB	7,84 cA	7,58 dA	6,71 dB	0,090 dA	0,074 daB	0,042 deB
V8	1,11 cB	1,29 aA	0,96 cC	7,20 dB	8,05 cA	6,00 eC	0,091 cA	0,055 dB	0,047 deB
CV (%)	7,44			6,02			7,16		

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si de acordo com o teste Tukey ( $p = 0,05$ )<sup>1</sup>Meios - B = berinjela; C = cenoura; F = feijão caupi; M = mandioca; S = soja; T= tomate; V8 = suco de vegetais;

<sup>2</sup>TCM= taxa de crescimento micelial entre o terceiro e sexto dia de incubação; <sup>3</sup>CM6 = crescimento micelial ao sexto dia de cultivo;

<sup>4</sup>Biomassa = Biomassa seca com 15 dias de cultivo; <sup>5</sup>E = ausência de luz; <sup>6</sup>LE = fotoperíodo de 12h; <sup>7</sup>L= luz constante.

majoritariamente de amido. Várias fontes de carbono são utilizadas na suplementação de meios de cultivo para fungos, como frutose, maltose, sacarose, além da glucose ou dextrose, presente na composição do meio BDA (batata-dextrose-ágar), considerado um meio de rotina na maioria dos laboratórios de micologia.

A composição dos meios, bem como os regimes de luz, induz variações no micélio aéreo e nas colônias (Luz, 2006). Neste estudo, os meios mais ricos em carbono, em ausência de luz induziram a formação de um micélio aéreo denso e cotonoso.

Segundo Hohl (1983), as fontes de alimento têm uma profunda influencia no crescimento, tanto na extensão linear ou no aumento da massa celular. Elas também determinam as chances de sobrevivência nas várias condições ambientais e formam a base para a reprodução e germinação dos esporos.

Quanto à esporulação, houve diferença significativa entre o comportamento dos dois isolados de *P. nicotianae* testados (ANOVA, Teste F  $p \geq 0,05$ ), sendo, portanto, apresentados separadamente os dados obtidos para cada um deles. A avaliação foi realizada aos 10 e 15 dias de crescimento nos diferentes meios levando em consideração apenas concentrações acima de  $10^4$  zoósporos/mL, sendo a concentração mínima de zoósporos utilizada nas metodologias de inoculação de *Phytophthora* spp. (Luz et al., 2008).

Aos 10 dias, os dois isolados apresentaram esporulação abaixo de  $10^4$  zoósporos/mL, na maioria dos meios líquidos avaliados, à exceção dos meios (V8)

e (t), que proporcionaram a esporulação máxima para o isolado 1365 de  $1,4 \times 10^4$  zoósporos/mL, e para o isolado 1405 de 5,5 (V8) e  $15,8 \times 10^4$  zoósporos/mL (t). Os regimes de luz influenciaram a esporulação apenas do isolado 1365, no meio (V8). Nos meios agarizados, também foram identificadas esporulações significativas somente nos meios (V8) e (t), havendo em (t), um decréscimo no número de zoósporos observados em relação à ausência de luz.

As maiores concentrações de zoósporos dos dois isolados foram observadas em culturas com 15 dias de incubação, sendo, portanto, apresentados somente os dados referentes a 15 dias de cultivo (Tabela 2). Os meios (b), (c), (t), e (V8) foram os únicos meios que proporcionaram esporulação nos três regimes de luminosidade para o isolado 1405. O meio (m), que proporcionou o maior crescimento, induziu esporulação do isolado 1365 apenas em (L/E) e do isolado 1405 em (L/E) e (L). Nos meios (f) e (s) não houve esporulação em nenhum regime de luz. As maiores concentrações de zoósporos foram proporcionadas pelo meio V8 em (E),  $1,7 \times 10^6$  (isolado 1365) e  $1,1 \times 10^6$  (isolado 1405).

Como a maioria dos meios apresentou baixa liberação de zoósporos em 10 dias de incubação, não foi possível correlacioná-la com a biomassa. As exceções foram os meios (V8) e (t), que proporcionaram a esporulação dos dois isolados em todas as condições avaliadas (Tabela 2). O isolado 1365 apresentou uma correlação negativa alta, quando

Tabela 2. Produção média de zoósporos ( $\times 10^4$ ) dos isolados 1365 e 1405 de *Phytophthora nicotianae* cultivados por 15 dias em diferentes meios de cultura líquidos e em três regimes de luz, à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$

Meios <sup>1</sup>	Isolado/Fotoperíodo							
	1365				1405			
	E <sup>2</sup>	LE <sup>3</sup>	L <sup>4</sup>	CV (%)	E	LE	L	CV (%)
B	0,4 bA	2,0 bcA	3,0 bA	17,36	20,8 bA	22,6 aA	10,6 bA	32,23
C	- bC	2,4 bB	4,4 abA	9,59	1,0 cB	2,0 bAB	3,6 bcA	25,11
F	- bA	- cA	- cA	-	- cA	- bA	- cA	-
M	- bB	1,6 bcA	- cA	17,05	- cB	4,2 bA	3,8 bcA	24,31
S	- bA	- cA	- cA	-	- cA	- bA	- cA	-
T	5,2 bA	2,3 bA	4,0 abA	34,32	18,2 bA	12,4 bA	24,6 aA	33,30
V8	172,6 aA	10,6 aB	5,8 aB	18,78	114,2 aA	19,2 aB	7,6 bB	14,40
CV (%)	28,87	21,17	11,41		32,62	26,08	25,62	

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si de acordo com o teste Tukey ( $p = 0,05$ ). <sup>1</sup>Meios - B= berinjela; C= cenoura; F= feijão; M= mandioca; S= soja; T= tomate; V8= suco de vegetais; <sup>2</sup>E= ausência de luz; <sup>3</sup>LE= fotoperíodo de 12h; <sup>4</sup>L= luz constante.

cultivado no meio (V8), e incubado na ausência de luz por 10 dias, indicando que quanto menor a biomassa, maior a esporulação, no entanto, como houve um maior desenvolvimento da colônia do isolado 1405 nestas condições, a correlação foi positiva e fraca. No regime de luz (LE), a correlação existente entre o crescimento e a esporulação produzida pelo isolado 1365 foi ainda mais alta e significativa, mas esse resultado foi proporcionado pelo efeito inverso ao da situação anterior, devido a maior produção de biomassa e menor concentração de zoósporos. A correlação do isolado 1405 nestas condições também foi fraca. A presença de luz durante todo o tempo de cultivo proporcionou ao isolado 1365 uma baixa esporulação e crescimento, havendo assim correlação nula. O isolado 1405 esporulou mais nessas condições, mas teve um crescimento equivalente ao isolado 1365, gerando uma correlação negativa alta e significativa. No meio (t), mesmo sendo observada a presença de quantidades significativas de zoósporos, não houve alta correlação entre as variáveis biomassa e esporulação (Tabela 3).

Poucas correlações altas foram identificadas aos 15 dias de incubação. Na ausência de luz, a biomassa e o número de zoósporos produzidos pelo isolado 1405 evoluíram de forma inversamente proporcional nos meios (b) e (t), apresentando coeficientes de correlação de -0,845 e -0,936, respectivamente. A relação entre carbono e nitrogênio é muito importante para o crescimento e esporulação dos fungos; alta concentração de nitrogênio reprime a esporulação e está diretamente ligada a concentração de carbono (Elliot, 1949; Griffin, 1993). Desse modo, a adequação de composições de meios de cultivo é fundamental para que se obtenham quantidades satisfatórias de inóculo. A glicose geralmente é estimuladora da esporângiogênese nas concentrações até 0,5g/L. Acima desta concentração, a formação de esporângios é normalmente inibida (Tariq, 1990).

A concentração mínima de nutrientes que permite o crescimento micelial é, muitas vezes, insuficiente para induzir a produção de esporos, ou seja, geralmente

Tabela 3. Coeficientes de correlação linear de Pearson ( $r_{xy}$ ) e *p*-valor entre as variáveis esporulação e biomassa produzida por dois isolados de *Phytophthora nicotianae* (1365 e 1405) em diferentes meios de cultura e fotoperíodos e avaliados aos 10 e 15 dias, à 25±2°C

Meios <sup>1</sup>	Fotoperíodo/dias de incubação <sup>2</sup>												
	E <sub>10</sub>		LE <sub>10</sub>		L <sub>10</sub>		E <sub>15</sub>		LE <sub>15</sub>		L <sub>15</sub>		
	1365	1405	1365	1405	1365	1405	1365	1405	1365	1405	1365	1405	
B	$r_{xy}$	-	-	-	-	0,250	-0,08	-0,408	-0,655	0,953	-0,757	0,745	0,463
	<i>p</i> -valor	-	-	-	-	0,685	0,898	0,495	0,229	0,012	0,138	0,148	0,431
C	$r_{xy}$	-	-	-	-	0,562	0,377	-	-0,845	0,612	-0,102	0,230	-0,007
	<i>p</i> -valor	-	-	-	-	0,323	0,530	-	0,071	0,272	0,869	0,708	0,906
F	$r_{xy}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>p</i> -valor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M	$r_{xy}$	-	-	-0,098	-	-0,379	-0,893	-	-	0,268	0,597	-	0,121
	<i>p</i> -valor	-	-	0,874	-	0,528	0,04	-	-	0,662	0,287	-	0,845
S	$r_{xy}$	-	-	-	-	-0,698	-0,678	-	-	-	-	-	-
	<i>p</i> -valor	-	-	-	-	0,189	0,208	-	-	-	-	-	-
T	$r_{xy}$	0,408	0,395	0,166	-0,534	0,060	-0,575	0,021	-0,936	-0,133	0,562	-0,243	-0,055
	<i>p</i> -valor	0,495	0,510	0,788	0,353	0,923	0,310	0,973	0,019	0,830	0,323	0,692	-0,929
V8	$r_{xy}$	-0,838	0,272	-0,971	0,021	0,00	-0,932	-0,310	0,406	0,266	-0,215	-0,343	0,404
	<i>p</i> -valor	0,076	0,657	0,005	0,973	1,00	0,021	-0,610	0,497	0,664	0,727	0,572	0,499

**p**-valor - Prob > |r| under H0: Rho = 0<sup>1</sup> Meios - B = berinjela; C = cenoura; F = feijão; M = mandioca; S = soja; T = tomate; V8 = suco de vegetais<sup>2</sup> Fotoperíodo/dias de incubação - E<sub>10</sub> = ausência de luz em 10 dias de incubação; LE<sub>10</sub> = alternância luminosa de 12h em 10 dias de incubação; L<sub>10</sub> = luz constante; E<sub>15</sub> = ausência de luz em 15 dias de incubação; LE<sub>15</sub> = alternância luminosa de 12h em 15 dias de incubação; L<sub>15</sub> = luz constante em 15 dias de incubação.

a condição nutricional ótima para o crescimento micelial não é necessariamente a melhor para produção de esporos e frequentemente inibe a reprodução (Véras, et al., 1997). Isto foi observado em relação aos meios (m) e (b), e ao meio (V8) neste trabalho.

A interferência negativa de certos componentes, incluindo a glicose e vários aminoácidos como a leucina, valina e asparagina foram relatadas por Leal et al. (1966) e Leal e Gomez-Miranda (1967). A inibição do crescimento e da reprodução sexual foi atribuída a acumulação de ácidos orgânicos no meio e a produção de níveis tóxicos de amônia.

Segundo Nozaki et al. (2004), nem sempre as condições que favorecem o crescimento do fungo são as mesmas para esporulação. Sabe-se ainda que, alguns meios de cultura são mais favoráveis para a esporulação de fungos que outros. Os meios a base de tomate (V8 e suco de tomate) proporcionaram o menor desenvolvimento das colônias, entretanto induziram a formação de esporângios, obtendo consequentemente as maiores concentrações de zoósporos dos isolados testados quando cultivados nestes substratos. Os vegetais que compõem tais meios possuem alto valor nutricional, por isso são citados por diversos autores como capazes de induzir a reprodução de muitos fungos “mitospóricos” (Queiroz et al., 2004; Brunelli et al., 2006; Dias Neto et al., 2010) e oomicetos (Guo; Ko, 1993; Luz et al., 2008). Existem variações na composição de meios formados a partir do (V8), com diferentes porcentagens destes componentes, bem como adição de  $\text{CaCO}_3$ , esteróis e vitaminas (Menezes; Assis, 2004). Este é um meio de cultura muito utilizado para o cultivo de *Phytophthora* spp. (Luz et al., 2008).

Para Ribeiro (1983), a esporulação é um processo complexo que envolve o potencial hídrico; nutrientes; esteróis; aeração; luz; temperatura; cátions como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ ; a idade da cultura; exudatos radiculares; e extratos de solo, com importância destes fatores variando entre espécies e isolados da mesma espécie de *Phytophthora*.

Segundo Caldwell (1998), algumas moléculas biológicas essenciais podem ser degradadas por radiações, que são fortemente absorvidas pelas células e ocasionam uma variedade de fotoproductos incompatíveis com a função celular. Na maioria dos meios avaliados, a presença de luz foi inversamente proporcional ao crescimento vegetativo, sendo, no

entanto, fator importante para a esporulação em meios a base de cenoura e mandioca. A exceção foi o meio (V8), que mesmo tendo inibido o crescimento dos patógenos em presença de luz, proporcionou as maiores concentrações de zoósporos quando cultivados em (E).

A literatura tem revelado que existe uma grande variação em relação ao efeito da luz sobre o crescimento e esporulação de *Phytophthora* spp., bem como entre isolados da mesma espécie. Alguns autores utilizam metodologias para esporulação de *P. nicotianae*, onde os isolados são cultivados na ausência de luz (Santos et al., 2004; Taylor; Pasche, 2008), outros sob luz constante (Widmer et al., 1998; Lamour et al., 2003). A ausência de luz para indução da esporulação já foi relatada para diversos fungos fitopatogênicos como *Alternaria brassicae* (Rotem et al., 1989), *Alternaria solani* (Lukens, 1963) e *Mycosphaerella fijensis* (Hanada et al., 2002).

Algumas espécies de *Phytophthora* possuem uma boa esporulação em meios sólidos quando submetidas a estímulos, já outras apresentam baixa produção de esporângios quando cultivadas nestes meios, demonstrando a influência de líquidos na produção de esporângios de várias espécies (Zentmyer e Erwin, 1970; Ribeiro, 1983). As maiores esporulações foram identificadas quando os isolados foram cultivados em meios líquidos, apesar de haver concentrações acima de  $10^4$  zoósporos/mL do isolado 1405 nos meios sólidos de (c), (b), (t) e (V8).

As baixas concentrações de zoósporos obtidas através do cultivo em meios sólidos são decorrentes da aeração, um fator que influencia significativamente a formação de esporângios. A espécie *P. nicotianae* raramente produz esporângios em micélio submerso, provavelmente devida à falta de oxigênio. Mesmo quando há a produção de esporângios nestas condições, a liberação e obtenção de suspensões de zoósporos também são dificultadas pela caducidade dos esporângios (Ribeiro, 1983).

Outro fator que influenciou a esporulação foi a idade da cultura. Em todos os meios analisados, as maiores concentrações de zoósporos foram obtidas após 15 dias de incubação. A formação de esporângios decresce com o tempo de cultivo em condições axênicas (Ayers; Zentmyer, 1971), entretanto, há variações nos tempos de cultivo ideais para a

esporulação até mesmo dentre isolados da mesma espécie. *Phytophthora nicotianae* possui esporulação tardia em comparação com espécies como *P. palmivora* que produz esporângios em abundância ao 5º dia de incubação. Isto pode ser atribuído a não caducidade dos esporângios de *P. nicotianae*, que algumas vezes se formam intercalarmente no micélio.

Os meios que induziram a formação das menores colônias possuíam pH inicial mais ácidos, entretanto os maiores crescimentos foram verificados em meios mais próximos da neutralidade. A concentração de H<sup>+</sup> nos meios testados também influenciou a esporulação, sendo observado que a acidez induziu a maior produção de zoósporos. Este fator de indução foi corroborado quando os isolados após cultivo nos meios anteriormente testados foram imersos em soluções salinas com pH 4,8 e mantidos nestas condições por 24h, verificando-se produção de zoósporos em todos os meios. A quantidade de zoósporos obtida através da imersão da massa micelial nos diferentes sais não diferiu significativamente.

O pH dos meios de cultivo testados correlacionou-se de forma positiva em relação a esporulação e negativamente em relação ao crescimento, corroborando a necessidade de fatores injuriantes ou estimulantes para a esporulação em grande parte dos fungos fitopatogênicos (Pulz; Massola Jr., 2009). Assim como a luz, o pH ótimo para a formação de esporângios é muito variável até mesmo entre isolados da mesma espécie (Ribeiro, 1983).

Devido o requerimento nutricional de *Phytophthora* spp., alguns trabalhos aliam a adição de sais como KNO<sub>3</sub> (Santos et al., 2004), com o ajuste do pH dos meios. Os meios (f) e (s), que possuem pH inicial de 6,10 e 6,27 respectivamente, apesar de induzirem os maiores crescimentos, não proporcionaram a formação de esporângios. Entretanto, quando a massa micelial formada nestes meios foi transferida para soluções com pH ácido, 24h nestas condições foi suficiente para produzir as maiores concentrações de zoósporos. Estes resultados indicam que dentre os fatores que induzem maior esporulação de *P. nicotianae*, o pH pode ter grande influência.

Os resultados deste estudo permitem corroborar a influência estimuladora de líquidos, dos requerimentos nutricionais, da luminosidade, do pH e idade da cultura na produção de esporângios, e consequentemente na obtenção de altas

concentrações de suspensões de zoósporos de *P. nicotianae*. A combinação do meio líquido a base do suco de vegetais (V8), o qual possui pH ácido em torno de 4,7, a ausência de luz e culturas com idade a partir de 15 dias induziram a esporulação em isolados desta espécie. Apesar de proporcionarem uma menor produção de zoósporos em relação ao (V8), os meios obtidos de berinjela e tomate aparecem como alternativa, podendo futuramente ser testadas formulações através da união dos mesmos.

A deficiência de métodos padrões eficazes para a esporulação desta espécie, induz a utilização de metodologias de inoculação que não permitem a quantificação e qualificação dos propágulos infectivos, reunindo em discos de meio de cultura vários propágulos infectivos como o micélio (conjunto de hifas), clamidósporos (estrutura vegetativa de sobrevivência), esporângios (estruturas reprodutivas assexuais) e zoósporos (esporos assexuais móveis formados no interior dos esporângios). A partir destes resultados, novos estudos poderão ser norteados, na tentativa de se obter as concentrações de zoósporos de várias espécies de *Phytophthora* necessárias para testes de patogenicidade com *P. nicotianae*, tornando-os mais apropriados à realidade de cultivo no campo, bem como aqueles que visam o controle da doença.

## Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsa de estudo. À Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacau-eira – CEPLAC, pela estrutura e recursos concedidos. Ao CNPq, pela concessão de recursos para a execução deste trabalho. A Lindolfo Pereira dos Santos Filho, pela colaboração nas análises estatísticas. Aos amigos do Laboratório de *Phytophthora* do CEPEC/CEPLAC, pelo convívio e ajuda nos experimentos.

## Literatura Citada

- ABDANUR, A.; SANTOS, A. F.; TRATCH, R. 2003. Crescimento micelial e esporulação de isolados de *Phytophthora* sp. patogênicos a Acácia-negra. Boletim de Pesquisa Florestal (Brasil) 47:33-42.

- AYERS, W. A.; ZENTMYER, G. A. 1971. Effect of soil solution and two soil on sporangium production by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 61:1188-1193.
- BRUNELLI, K. R. et al. 2006. Effect of culture media and light exposure on the sporulation of *Cercospora zeae-maydis*. *Summa Phytopathologica (Brasil)* 32:92-94.
- CALDWELL, M. M. et al. 1998. Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 46:40-52.
- COOPERMAN, C. J.; JENKINS, S. F. 1986. Conditions influencing growth sporulation of *Cercospora asparagi* and *Cercospora* blight development in Asparagus. *Phytopathology* 76:617-622.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. 1995. Basic plant pathology methods. Lewis Publishers. Boca Raton, Florida, Lewis Publishers.
- DIAS NETO, J. J. et al. 2010. Hot spots for diversity of *Magnaporthe oryzae* physiological races in irrigated rice fields in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45:252-260.
- ELLIOTT, E. S. 1949. The effect of the sugar concentration on conidial size of some species of *Helminthosporium*. *Phytopathology* 39:953-958.
- GRIFFIN, D. H. 1993. Fungal Physiology. 2<sup>ed</sup>. New York, Wiley-Liss.
- GUO, L. Y.; KO, W. H. 1993. Two widely accessible media for growth and reproduction of *Phytophthora* and *Pythium* Species. *Applied and Environmental Microbiology* 59:2323-2325.
- HANADA, R. E.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. 2002. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. *Fitopatologia Brasileira* 27:170-173.
- HAWKER, L. E. 1957. The physiology of reproduction in fungi Cambridge: Cambridge University Press.
- HOHL, H. R. 1983. Nutrition of *Phytophthora*. In: Erwin, D. C.; Bartnicki-Garcia, S.; Tsao, P. H. eds. *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology*, APS, Minnesota. pp. 41-54.
- LAMOUR, K. H. et al. 2003. Etiology of *Phytophthora drechsleri* and *P. nicotianae* (=P. parasitica) diseases affecting oriculture crops. *Plant Disease* 87:854-858.
- LEAL, J. A.; GOMEZ-MIRANDA, B. 1967. Effect of amino acids and organic acids on the sexual reproduction of species of *Phytophthora* and *Pythium*. *Transactions of the British Mycological Society* 50:77-84.
- LEAL, J. A.; GOMEZ-MIRANDA, B.; NICOLAS, G. 1966. Formation of toxic substances by fungi in the degradation of some amino acids. *Canadian Journal of Microbiology* 12:1073-1076.
- LUKENS, R. J. 1963. Photo-inhibition of sporulation in *Alternaria solani*. *American Journal of Botany* 50:721-724.
- LUZ, E. D. M. N. 2006. O gênero *Phytophthora* no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 31:80-81.
- LUZ, E. D. M. N.; MATSUOKA, K. 2001. *Phytophthora*: fungo, protista ou chromista? In: Luz, E. D. M. N.; Santos, A. F. dos; Matsuoka, K.; Bezerra, J. L. eds. *Doenças causadas por Phytophthora no Brasil*. Campinas, SP, Livraria e Editora Rural. pp. 1-14.
- LUZ, E. D. M. N. et al. 2008. Glossário ilustrado de *Phytophthora*: técnicas especiais para o estudo de Oomicetos. Itabuna BA, FAPESB/CEPLAC 204 p.
- MASANGKAY, R. F. et al. 2000. Characterization of sporulation of *Alternaria alternata* f.sp. *sphenocleae* Biocontrol Science and Technology 10:385-397.
- MENEZES, M.; ASSIS, S. M. P. 2004. Guia prático para fungos fitopatogênicos. 2<sup>a</sup>. ed. Recife, PE. UFRPE. 106 p.
- NOZAKI, M. H.; CAMARGO, M.; BARRETO, M. 2004. Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes meios de cultura, condições de temperatura e luminosidade. *Fitopatologia Brasileira* 29:429-432.
- PELCZAR, M. J.; CHANG, E. C. S.; KRIEG, N. R. 1996. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. 2<sup>ed</sup>. São Paulo, SP, Makron Books. Vol.2.

- PULZ, P.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. 2009. Efeito de meios de cultura e fatores físicos no crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *A. solani*. *Summa Phytopathologica* 35:119-124.
- QUEIROZ, F. M.; BATISTA, U. G.; BROMMNSCHENKEL, S. H. 2004. Avaliação de meios de cultura no crescimento micelial e esporulação de *Alternaria brasiliensis*. *Fitopatologia Brasileira* 29:541-543.
- RIBEIRO, O. K. 1983. Phisiology of asexual sporulation and spore germination in *Phytophthora*. In: Erwin, D. C.; Bartnicki-Garcia, S.; Tsau, P. H. eds. *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology*. Saint Paul, Minissota, American Phytopathological Society. pp.139-147.
- ROTEM, J.; BICKLE, W.; KRANZ, J. 1989. Effect on environment and host on sporulation of *Alternaria macrospora* in cotton. *Phytopathology* 79:263-266.
- SANTOS, A. F.; LUZ, E. D. M. N.; SOUZA, J. T. 2004. *Phytophthora boehmeriae* causando a gomose da acácia-negra no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 29:144.
- SAS INSTITUTE. 2004. SAS/STAT 9.1 user's guide. 1 ed. Sas Institute, Cary. 5136p.
- TARIQ, V. N. 1990. Factors influencing zoosporangia formation by *Phytophthora fragariae* in vitro. *Mycological Research* 94:205-210.
- TAYLOR, R. J.; PASCHE, J. S. 2008. A Foliar blight and tuber rot of potato caused by *Phytophthora nicotianae*: New occurrences and characterization of isolates. *Plant Disease* 92:492-503.
- VÉRAS, S. M.; GASPARROTO, L.; MENEZES, M. 1997. Variabilidade fisiomorfológica de *Colletotrichum guanicola* em diferentes substratos. *Arquivos de Biologia e Tecnologia (Brasil)* 40:297-305.
- WIDMER, T. L.; GRAHAM, J. H.; MITCHELL, D. J. 1998. Histological comparasion of fibrous root infection of disease-tolerant and susceptible citrus hosts by *Phytophthora nicotianae* and *P. palmivora*. *Phytopathology* 88:389-395.
- ZENTMYER, G. A.; ERWIN, D. C. 1970. Development and reproduction of *Phytophthora*. *Phytopathology* 60:1120-1127.

