

COMPORTAMENTO DO FUNGO *Colletotrichum gossypii* South. var. *cephalosporioides* Costa EM SUBSTRATO COM DIFERENTES FONTES DE NITROGENIO (1)

Yvo de Carvalho *

Carluce Gomes de Sã e Carvalho **

INTRODUÇÃO

O nitrogênio é constituinte essencial do tecido fúngico, já que está presente em todas moléculas de aminoácidos e consequentemente nas proteínas. Tanto os substratos naturais quanto os sintéticos e semi-sintéticos utilizados no cultivo de fungos, devem conter uma fonte de nitrogênio, seja ela um composto orgânico ou inorgânico. Lilly & Barnett em 1951, observaram que os fungos apresentam diferenças na habilidade para utilização das diversas fontes de nitrogênio. No presente trabalho procurou-se averiguar o comportamento do fungo *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* Costa, agente causal da ramulose do algodoeiro, quando cultivado em substrato contendo diferentes fontes de nitrogênio, com o objetivo final de determinar a composição ideal para abundante produção de inóculo em curto lapso de tempo.

(1) - Trabalho realizado em 1969, no laboratório da Seção de Fungicidas do Instituto Biológico de São Paulo, sob orientação do Dr. C.A. Campacci.

* - Docente do Departamento Fitossanitário da EAV - U.F.GO.

** - Docente do Departamento de Botânica do ICB - U.F.GO.

O fungo *Colletotrichum phomoides*, quando cultivado em presença de nitrato como fonte de nitrogênio, apresentou melhor crescimento que em nitrito, amônio e diversos aminoácidos, menos a leucina. Dentre as fontes orgânicas de nitrogênio, melhor crescimento foi observado em asparagina, ácido glutâmico e glicina (Kurtz - 1960). Em substrato de cultura contendo nitrogênio sob a forma de nitrato, o crescimento de *Anthrobotrys robusta* foi bastante reduzido (Blackburn & Hayes - 1966). Em 1964, Ward observou que, em testes com basidiomicetos, em meio de glucose adicionada de sais minerais e suplementado com tiamina e piridoxina, houve bom crescimento miceliário quando a fonte de nitrogênio foi a L-glutamina, L-asparagina, uréia e diversos aminoácidos. Nesse teste o pH do meio foi mantido na faixa entre 3,0 e 6,0, mediante o uso de tampão. Para *Macrophomina phaseoli*, Singh, em 1967 observou que a melhor absorção de nitrogênio foi a partir do nitrato de potássio, seguindo-se sucessivamente o ácido aspártico, a asparagina, a peptona, o tartarato de amônia, a uréia e o nitrito de sódio. Obteve-se bom crescimento em *Pythium aphanidermatum* quando se usou o L-D-ácido aspártico e a L-asparagina como fonte de nitrogênio.

O fungo *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* Costa é pouco estudado com relação as suas exigências nutricionais e aos fatores ambientais. Excetuando-se os trabalhos de Malaguti (1955), na Venezuela, sobre o efeito da temperatura e tempo para desenvolvimento dos conídios "in vitro", pouco se estudou a respeito da fisiologia desse patógeno do algodoeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

As cêpas de *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* Costa usadas nesse trabalho foram isoladas a partir de plantas exibindo os sintomas típicos de ramulose tardia, em algodoais localizados no município de Santa Helena de Goiás.

O teste foi realizado em substrato sólido, distribuí

do em placas de Petri tamanho 120 x 20 mm, tendo cada placa recebido 30 ml de meio. Para o meio b \bar{a} sico foi usada a f \bar{o} rmlula sugerida por Lilly & Barnett (1957), e comum a todos os tratamentos do teste. Todos os substratos recebem dextrose como fonte de carb \bar{o} no.

Como fonte organica de nitrogenio foram usados os seguintes produtos: peptona, metionina, asparagina e salic \bar{i} tato de am \bar{o} nia. O nitrato de s \bar{o} dio foi usado como fonte inorganica de nitrogenio. O pH dos diversos substratos foi corrigido para 7,0 antes da autoclavagem (120 $^{\circ}$ C/minutos). A identifica \bar{c} o dos substratos foi realizada conforme a rela \bar{c} o abaixo:

- T $_1$ - meio b \bar{a} sico (testemunha)
- T $_2$ - meio b \bar{a} sico + peptona
- T $_3$ - meio b \bar{a} sico + metionina
- T $_4$ - meio b \bar{a} sico + asparagina
- T $_5$ - meio b \bar{a} sico + nitrato de s \bar{o} dio
- T $_6$ - meio b \bar{a} sico + salicilato de am \bar{o} nia

A quantidade da fonte de nitrogenio adicionada foi calculada de tal forma que, cada litro de substrato, contivesse' o equivalente a 2g de asparagina.

O delineamento experimental usado foi o de blocos casualizados com cinco repeti \bar{c} es. Cada placa contendo substrato' foi inoculada com um disco de agar - \bar{a} gua, de 1 mm de di \bar{a} metro,' contendo hifas do fungo. Logo depois as placas foram colocadas a incubar em estufa a 28 $^{\circ}$ C.

A determina \bar{c} o do crescimento vegetativo foi realizada pela medi \bar{c} o do di \bar{a} metro m \bar{e} dio das col \bar{o} nias, tomados a cada 24 horas, e a partir do segundo at \bar{e} o s \bar{e} timo dia ap \bar{o} s inocula \bar{c} o. Foram realizadas observa \bar{c} es a respeito da intensidade de esporula \bar{c} o e aspecto da col \bar{o} nia f \bar{u} ngica nos diversos substratos de cultura.

RESULTADOS

As medi \bar{c} es do di \bar{a} metro m \bar{e} dio das col \bar{o} nias, ap \bar{o} s 168

horas de incubação, foram realizadas com régua graduada, interpondo-se a placa entre o observador e um foco de luz, tendo-se registrado os resultados expressos no quadro abaixo:

QUADRO I - Crecimento vegetativo de *Colletotrichum gossypii* South. var. *cephalosporioides* Costa, em substrato contendo diferentes fontes de nitrogenio, sendo o diametro médio das colônias, após 168 horas de incubação a 28°C expresso em milímetros.

REPETIÇÕES TRATAMENTOS	Bloco I	Bloco II	Bloco III	Bloco IV	Bloco V	médio
T ₁ - (testemunha)	74	66	72	77	74	72,60
T ₂ - (peptona)	96	98	100	100	100	98,80
T ₃ - (metionina)	68	62	67	68	69	66,80
T ₄ - (asparegina)	68	83	76	65	75	73,40
T ₅ - (nitrito de sódio)	64	68	71	68	67	67,60
T ₆ - (Salic. de amônia)	7	6	7	8	7	7,00

Análise de Variância

F.V	G.L	S.Q	Q.M	F
Tratamentos	5	23.211,80	4.632,36	298,86 ++
Blocos	4	29,16	7,29	-
Resíduo	20	310,04	15,50	-

T O T A L 29 23.551,00 - -

F (5,20). 01 = 4,10

C.V. = 6,11%

Teste de Tuckey - (1%) = 9,69

T₂ T₄ T₁ T₅ T₃ T₆
 98,80 73,40 72,60 67,60 66,80 7,00

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O crescimento miceliano, de acordo com as confirmações estatísticas, foi notavelmente mais abundante e vigoroso no substrato contendo peptona (T_2), seguindo-se asparagina, a testemunha, o nitrato de sódio e a metionina, e finalmente o salicilato de amônia que exerceu o efeito inibidor do desenvolvimento do fungo. Um ensaio preliminar, executado imediatamente antes dessa experiência, no qual se usou as mesmas fontes de nitrogênio, indicou a peptona como o tratamento que promoveu maior crescimento da colônia; a metionina e asparagina comportaram-se como testemunhas, enquanto que o nitrato de sódio foi ligeiramente inferior. Ainda nesse ensaio preliminar, realizado com o objetivo de se averiguar as principais dificuldades a serem equacionadas no decorrer da experiência, observou-se que o salicilato de amônio exerceu efeito inibidor sobre *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* Costa, mas as colônias de *Penicillium* sp, contaminante presente em várias placas desse tratamento, desenvolveram-se e esporularam normalmente.

Em substrato contendo peptona (T_2), as colônias desenvolveram-se circulares, bordos bem nítidos, margens ligeiramente esbranquiçadas, mas a cor cinza predominava sobre quase toda a colônia. Nas proximidades do disco de inoculação o micélio mostrou-se cinza pardacento, seguindo-se de um halo claro. Houve esporulação abundante, tendo-se observado a formação de numerosas massas rosadas de conídios sob o micélio cotonoso aéreo e abundante. Na testemunha (T_1), a ausência de fonte de nitrogênio parece não ter prejudicado o crescimento linear das hifas do fungo, pois esse exibiu colônias pouco densas e esbranquiçadas, exceto nas proximidades do disco de inoculação, onde o micélio aéreo apresentou-se acinzentado. As colônias exibiram formato circular e mostraram-se inicialmente hialinas, com bordos profusos, pouco nítidos. Praticamente não houve esporulação. As colônias formadas em substratos contendo metionina (T_3), mostraram-se cir

culares com bordos ondulados e bem definidos. A coloração predominante foi o cinza, com margens claras. Colonias pouco densas, não se tendo observado a formação de massas rosadas de conídios. No substrato contendo asparagina (T_4), formaram-se colonias densas, cor cinza brilhante, formato circular, bordos nítidos e margens claras, micélio aéreo com alguns setores radiais. O micélio, apesar da cor cinza, mostrava-se ligeiramente rosado devido a grande quantidade de conídios formados dispersadamente, sem haver a formação de verdadeiras massas de conídios, como ocorreu em outros substratos. A esporulação foi menos intensa nos setores radiais, e mais abundante nas proximidades do disco de inoculação. O nitrato de sódio (T_5), como fonte de nitrogênio no substrato, induziu a formação de colonias circulares, cinza, de superfícies heterogênea e bordos pouco nítidos. Parece não ter havido esporulação, não se tendo observado a formação de massas de conídios nem mesmo nas proximidades do disco de inoculação. No substrato contendo salicilato de amônia (T_6), o fungo não se desenvolveu. Foram observados certos filamentos micelianos eretos partindo do disco-inóculo, e assumindo o aspecto de espinhos brancos. Não ocorreu esporulação.

Em face das observações acima mencionadas, e considerando-se os resultados obtidos nessa experiência, podemos concluir que:

- a - a substância usada como fonte de nitrogênio no substrato de cultura afeta sensivelmente o crescimento miceliano, a intensidade de esporulação e o aspecto morfológico da colônia de *Colletotrichum gossypii* South. var. *cephalosporioides* Costa. A peptona (T_2) foi a melhor fonte de nitrogênio tanto para crescimento miceliano quanto para esporulação, seguindo-se a asparagina que, apesar de não diferir estatisticamente da testemunha em relação ao crescimento do micélio, provocou intensa esporulação.

- b - o salicilato de amônia inibiu fortemente tanto o crescimento do micélio quanto a esporulação do fungo. Essa inibição exercida sobre *Colletotrichum gossypii* South. var. *cephalosporioides* Costa não é generalizada para outros fungos.
- c - das fontes de nitrogenio testadas, pode-se afirmar que a peptona é a mais recomendável quando se pretende produzir, a curto prazo, inóculo em conídios e fragmentos de hifas.
- d - a adição ou não de fontes de nitrogenio ao substrato, parece não afetar profundamente o crescimento linear das hifas desse fungo, mas sim a ramificação e pigmentação das mesmas, pois o micélio mostrou-se claro e pouco denso na testemunha.

RESUMO

Nesse trabalho procurou-se observar o efeito de diversas substâncias nitrogenadas sobre o crescimento miceliano, esporulação e aspectos morfológicos das colônias do fungo *Colletotrichum gossypii* South. var. *cephalosporioides* Costa em substrato sólido. Usou-se um substrato sintético como meio-básico e a este se adicionou peptona, metionina, asparagina, nitrato de sódio ou salicilato de amônia, conforme o tratamento. A testemunha não recebeu qualquer fonte de nitrogenio. Concluiu-se que a peptona foi o melhor tratamento para esporulação e crescimento miceliano, seguindo-se a asparagina que foi eficiente na indução da esporulação. O salicilato de amônia exerceu efeito inibidor do crescimento vegetativo e da esporulação do fungo. Para produção de inóculo, a curto prazo, recomenda-se o uso da peptona como fonte de nitrogenio. Foram observadas diferenças na pigmentação, bordos e densidade das colônias. A esporulação, embora abundante em substratos contendo peptona e asparagina, ocorreu em forma de verda-

deiras massas localizadas de conídios na primeira, e como conídios dispersos na segunda.

THE BEHAVIOR OF THE FUNGUS *Colletotrichum gossypii* SOUTH VAR. *cephalosporioides* Costa IN SUBSTRATE CONTAINING DIFFERENT SOURCES OF NITROGEN

S U M M A R Y

In this experiment, the effect of different nitrogenous substances on the mycelium growth, sporulation and morphological aspects of the colonies of the fungus *Colletotrichum gossypii* South. var. *cephalosporioides* Costa planted in a solid substrate were observed. A synthetic substrate was used as a basic medium, and to this was added peptone metionine, asparagine, sodium nitrate or ammonium salicylate, according to the treatment. The control (group) received no nitrogen whatsoever. It was concluded that peptone was the best treatment for sporulation and mycelium growth, and that the next best was asparagine which was helpful in inducing sporulation. Ammonium salicylate inhibited the vegetative growth and the sporulation of the fungus. For the production of inocule, over a short period of time, the use of peptone as source of nitrogen is recommended. Differences in the pigmentation, edges, and density of the colonies were observed. Sporulation, though abundant in the substrate containing peptone and asparagine, occurred in the form of localized masses of conidia in the first and as dispersed conidia in the second.

B I B L I O G R A F I A

- 1 - BLACKBURN, F. & HAYES, H.A. - 1966 - Studies on the nutrition of *Anthrobotrys oligospora* Fres. and *A. robusta* Dudd. I - The saprophitic phase. II - The predaceous phase. - Ann.'

- Appl. Biol. 58 (1) : 43 - 50 ; 51 - 60 Univ. Newcastle --
(ram - 45 - 3470).
- 2 - DUNN, C.B. - 1950 - Industrial Microbiology Laboratory Manual - Massachusetts Institute of Technology.
 - 3 - GROVER, P.K. & SIDHU, J.S. - 1966 - Effect of the nitrogen sources on the growth of *Pythium aphanidermatum* (Edson) Ftz. Sydowia 19 (1 - 6) : 231 - 237 (5 tables, Punjab Ag. Univ., Ludhiana - India) (Bam 46 - 881)
 - 4 - KRAFT, J.M. & ERWIN, D.C. - 1967 - Effect of nitrogen sources on growth of *Pythium aphanidermatum* e *P. ultimum* - Phytopath. 57 (4) : 374 - 376. Washington (RAM - 46 - 2621)
 - 5 - KURTZ, Elizabeth B. (Univ. Minn., Minneapolis) & FERGUS, C.L. - 1964 - Nitrogen nutrition of *Colletotrichum coccodes* - Phytopathology, 54 (6) : 692, 1 graph, 1 table, (RAM - 64 3142).
 - 6 - LILLY, V.G. & BARNETT, L. - 1951 - Physiology of the Fungi.- First edition, Mc Grow Hill Book Company, Inc., 464 pp., New York - London - Toronto.
 - 7 - MALAGUTI, G. - 1957 - La escobilla del algodón in Venezuela. (Little broom of cotton in Venezuela) - Agron. Trop. Maracay, 5, 2, pp. 73 - 86, 5 pl (received january, 1957).





