

ESPORULAÇÃO DE *Botryotinia ricini* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

SPORULATION OF *Botryotinia ricini* IN DIFFERENT CULTURE MEDIA

Haroldo Antunes CHAGAS¹; Daniel Dias ROSA²; Marco Antonio BASSETO²;
Maurício Dutra ZANOTTO³; Edson Luiz FURTADO³

1. Engenheiro Agrônomo, Mestrando do curso de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA, campus Botucatu, Botucatu, SP, Brasil. 2. Engenheiro Agrônomo, Doutorando do curso de Pós-graduação em Agronomia UNESP- FCA, Botucatu, SP, Brasil. 3. Professor, Doutor, UNESP – FCA, Botucatu, SP, Brasil.
elfurtado@fca.unesp.br

RESUMO: A mamoneira é uma espécie tropical e está sujeita a diversas doenças, que causam grandes prejuízos, dentre essas, o mofo cinzento (*Botryotinia ricini*) é uma das mais importantes. A esporulação deste fungo foi avaliada nos meios de culturas BDA; Aveia-Ágar; Mazeina-Ágar; Arroz-Ágar; Folhas de mamona triturada-ágar (FM); FM-CaCO₃; suco V8 a 5% (V8-5%); V8-10%; V8-20%; suco de tomate a 5% (TJ-5%); TJ-10%; TJ-20%. A esporulação do fungo, nos diferentes meios de culturas, foi avaliada no 8º dia de incubação. Os dados foram analisados utilizando método de comparação entre médias, através do teste Tukey a 5% de probabilidade, sendo os dados transformados para (X+1)^{0.5}. Todos os meios de culturas testados se mostraram aptos para a produção de conídios, mas obteve-se os melhores resultados no meio de cultura V8-20%, com 5,7 x 10⁶ conídios/mL, ficando em segundo lugar o meio BDA, com uma esporulação média de 3,5 x 10⁶ conídios/mL.

PALAVRAS-CHAVE: *Amphobotrys ricini*. *Ricinus communis*. Inoculo. Seleção genética.

INTRODUÇÃO

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma espécie de origem tropical que vegeta naturalmente desde a longitude 40^o Norte até 40^o Sul. O óleo extraído de suas sementes é um dos mais versáteis da natureza, com inúmeras aplicações industriais, dentre atualmente utilizado como um combustível limpo e renovável, participando da formulação do biodiesel (CHIERICE; CLARO NETO, 2001).

Embora seja uma planta com grande capacidade de adaptação às mais diferentes regiões do mundo, a mamoneira está sujeita a doenças causadas por diversos microorganismos que causam prejuízos de grande expressão econômica, principalmente quando as condições climáticas lhes são favoráveis (FORNAZIERI JÚNIOR, 1986; SAVY FILHO, 1999).

Entre essas doenças, o mofo cinzento, causado pelo fungo *Botryotinia ricini* (G.H. Godfrey) Whetzel (anamorfo *Amphobotrys ricini* (Buchw.) Hennebert, sin. *Botrytis ricini* N.F. Buchw.), é uma das mais importantes. A doença causa grandes prejuízos à produção, pois destrói inflorescências e cachos, reduzindo a produção de óleo pela diminuição dos frutos colhidos (LIMA; ARAÚJO; BATISTA, 2001).

O mofo cinzento foi constatado pela primeira vez no Brasil no estado de São Paulo, em 1932 (GONÇALVES, 1936) e desde então causa muitos prejuízos por ano, principalmente nos

últimos anos com a intensificação dos plantios comerciais da cultura, sendo atualmente considerada sua principal doença (FORNAZIERE JÚNIOR, 1986).

A doença pode ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, que podem variar de pequenas manchas de coloração azulada, passando por exudação amarelada das lesões, formação de teia micelial e completa necrose de folhas, pecíolos, frutos e a morte da planta (KIMATI, 1980), mas a principal agravante da doença é que mesmo em planta pouco atacada, verifica-se uma diminuição do teor de óleo nos frutos, ocasionando uma quebra na rentabilidade da cultura (GODFREY, 1923).

Visando se aumentar a resistência das plantas de mamoneira ao mofo cinzento, o melhoramento genético da espécie é imprescindível, e para que essa etapa ocorra, o cultivo e a produção *in vitro* deste patógeno é de extrema necessidade, assim como a alta produção de conídios, visando sua utilização para seleção de genótipos resistentes a doença.

Com base nessa necessidade, efetuaram-se ensaios objetivando encontrar um meio de cultura que melhor favorecesse a produção de conídios pelo fungo.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Setor de Defesa Fitossanitária, do Departamento de Produção

Vegetal, da Faculdade de Ciências Agronômicas - FCA, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus Botucatu.

Utilizou-se o isolado L3(EMBRAPA-CNPA), o qual vem sendo usado como agente selecionador dos genótipos resistentes de mamoneira do programa de melhoramento FCA/UNESP, sendo esse mantido em meio de cultura BDA, a 26°C, no escuro.

Os meios de culturas testados foram: BDA (39 g/L (Acumedia Co.)); Aveia-Ágar (20 g/L de aveia em flocos (Quaker®), 18 g/L de ágar); Maizena-Ágar (20 g/L de amido de milho (Maizena®), 18 g/L de Agar); Arroz-Ágar (20 g/L de arroz cozido moído, 18 g/L de Agar); FM (80 g/L de folhas de mamona trituradas, 18 g/L de ágar); FM-CaCO (80 g/L de folhas de mamona trituradas em 200 mL de água destilada, 18 g/L de Agar, 3,2 g/L de CaCO₃); V8-5%(5%(v/v) de suco V-8(Campbell Co.), 3,2 g/L de CaCO₃, 18 g/L de ágar); V8-10%(10%(v/v) de suco V-8(Campbell Co.), 3,2 g/L de CaCO₃, 18 g/L de ágar), V8-20%(20%(v/v) de suco V-8(Campbell Co.), 3,2 g/L de CaCO₃, 18 g/L de ágar); TJ-5% (5%(v/v) de suco de tomate natural (Superbom), 3,2 g/L de CaCO₃, 18 g/L de ágar); TJ-10% (10%(v/v) de suco de tomate natural (Superbom), 3,2 g/L de CaCO₃, 18 g/L de ágar); TJ-20% (20%(v/v) de suco de tomate natural (Superbom), 3,2 g/L de CaCO₃, 18 g/L de ágar). Os meios foram então esterilizados em

autoclave por 20 minutos à 120°C, vertendo-os em placas de petri para a utilização.

Para a inoculação dos meios utilizou-se um disco, de 5 mm de diâmetro colonizado, obtido da cultura crescida em BDA, a 26°C no escuro, por 5 dias, em placa de petri. O experimento foi inteiramente casualizado, com três repetições, considerando uma unidade amostral uma placa de petri contendo o meio a ser avaliado. Os diferentes meios foram incubados em câmara de crescimento tipo BOD, a 26°C, por 8 dias, no escuro.

A esporulação do fungo, nos diferentes meios de culturas, foi avaliada no 8º dia de incubação. Cada placa de petri, individualmente, foi lavada com um volume de 10 mL de água destilada esterilizada, precedendo-se a coleta da suspensão, a qual foi utilizada para determinar a concentração dos conídios (conídios/mL), através de quatro leituras em câmara de Neubauer.

Os dados foram analisados utilizando método de comparação entre médias, através do teste Tukey a 5% de probabilidade, sendo os dados transformados para $(X+1)^{0,5}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os meios de culturas testados se mostraram aptos para a produção de conídios, sendo que a produção média variou de $2,5 \times 10^5$ conídios/mL, para o meio Maizena-Ágar, até $5,7 \times 10^6$ conídios/mL, no meio V8-20%, (Figura 1).

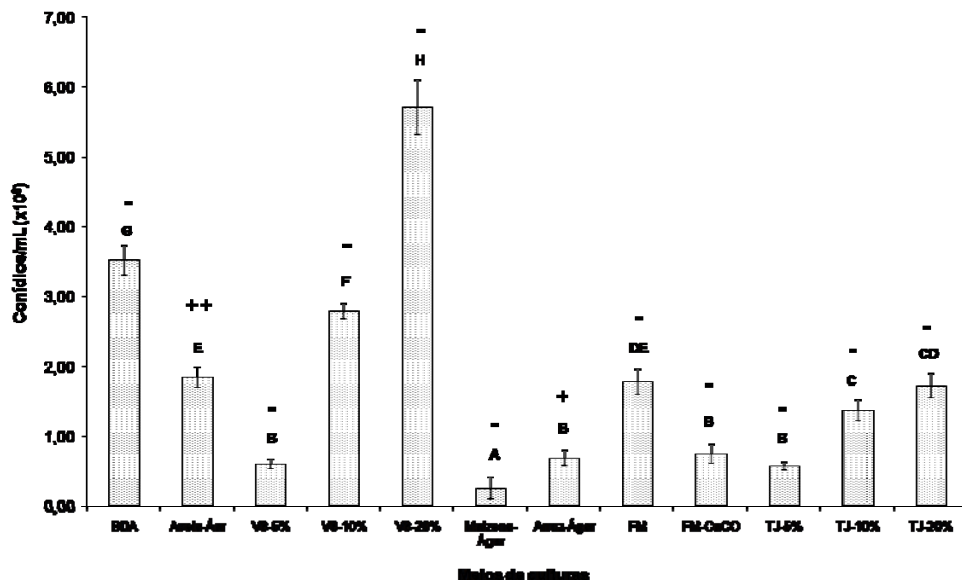


Figura 1. Esporulação média do *Botryotinia ricini* em diferentes meios de culturas, após 8 dias de incubação em câmara de crescimento, a 26°C, no escuro. Produção de escleródio: ausente (-), mediana (+), abundante (++) . Barra de variação indicando o desvio padrão das leituras. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Ao contrário do observado na literatura para outros fungos, como *Diplodia* (BIZZETTO; HOMECHIN; SILVA, 2000), os meios de aveia-ágar, arroz-ágar não estimularam a esporulação, assim como os meios a base do tecido vegetal do hospedeiro, demonstrando que esses meios apresentam, ou não, algum fator nutricional que estimularia a esporulação do *Botryotinia ricini*.

Verificou-se que o melhor meio para produção de conídios de *Botryotinia ricini* é o V8-20%, ficando em segundo lugar o meio BDA, com uma esporulação média de $3,5 \times 10^6$ conídios/mL.

Os meios a base de folhas de mamona não se mostrar eficiente para a produção de conídios, produzindo $1,8$ e $1,3 \times 10^5$ conídios/mL, nos meios FM e FM-CaCO, respectivamente.

Quando analisado estatisticamente, pelo teste tukey, a 5% de probabilidade, o meio de cultura maizena-ágar diferenciou estatisticamente, sendo o meio com menor produção de conídios, já os meios V8-5%, TJ-5%, Arroz-ágar e FM-CaCO não diferiram estatisticamente entre eles, assim como os meios TJ-10%, TJ-20% e FM que ficaram na mesma classe estatística. Já os meios aveia-ágar, V8-10%, BDA e V8-20% diferiram estatisticamente entre ele, apresentando uma produção de conídios significativa, sendo eles separados em classes distintas, da menor para a maior produção, respectivamente (Figura 1).

Observou-se a formação de escleródios em alguns meios (Figura 1), ocorrendo nos meios arroz-ágar e aveia-ágar, sendo mais intensamente produzido no meio a base de aveia.

Além das evidentes diferenças na quantidade de conídios produzidos nos diferentes meios estudados, observa-se que há uma interação fisiológica entre o fungo e o meio de cultura, sendo evidenciado pela produção de escleródios em alguns meio e não sendo produzidos nos outros.

CONCLUSÕES

O meio de cultura V8-20% proporcionou a melhor esporulação para o fungo *Botryotinia ricini*.

O meio de cultura aveia-ágar proporciona a maior produção de estruturas de resistência do tipo escleródios.

ABSTRACT: The castor bean plant is a tropical species and is subject to various diseases, which cause great losses. Among these diseases, the gray mold (*Botryotinia ricini*) is one of the most important. The fungus spore production was evaluated in the media of cultures BDA; Oats-Agar; Mazeina-Agar; Rice-Agar; castor-bean crushed leaves-agar (FM), FM-CaCO₃; V8 juice to 5% (V8-5%); V8-10%; V8-20% and tomato juice at 5% (TJ-5%); TJ-10% and TJ-20%. The production of spore in different media of cultures was evaluated at 8th days of incubation. The data were analyzed using the comparison of means, through the test Tukey a 5% probability, and the data processed for $(X + 1)^{0.5}$. All means of crops tested were able to produce conidia, but the best results was obtained with the culture medium V8-20% (5.7×10^6 conidia / mL) and BDA (3.5×10^6 conidia / mL).

KEYWORDS: *Amphobotrys ricini*. *Ricinus communis*. Inoculum. Genetic selection.

REFERÊNCIAS

- BIZZETTO, A.; HOMECHIN, M.; SILVA, H. P. *Diplodia maydis* e *Gibberella zeae*. Produção micelial e esporulação em substratos naturais e meios de cultura. **Summa Phytopathologica**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 88-91, jan. 2000.
- CHIERICE, G. O; CLARO NETO, S. Aplicação industrial do óleo. In: AZEVEDO, D. M. P. de; LIMA, E. F. (Eds) O agronegócio da mamona no Brasil. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2001. p. 89-119
- FORNAZIERI JUNIOR, A. **Mamona**: uma rica fonte de óleo e de divisas. São Paulo: Ícone, 1986. 72 p.
- GODFREY, G.H. Gray mold of castor bean. **Journal of Agricultural Research**, Punjab-Pakistan, v. 23, n. 9, p. 679-716, 1923.
- GONÇALVES, R. D. Mofo cinzento da mamoneira. **O Biológico**, São Paulo, v. 11, p. 232- 235, 1936.
- KIMATI, H. Doenças da mamoneira – *Ricinus communis* L. In: GALLI, F. (coord.) **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. v. 2, p. 347-351.

LIMA, E. F.; ARAÚJO, A. E.; BATISTA, F. A. S. Doenças e seu controle. In.: AZEVEDO, D. M. P. de; LIMA, E. F. (Eds) O agronegócio da mamona no Brasil. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2001. p. 191-212.

SAVY FILHO, A. Melhoramento da mamona. In: BOREM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora UFV, 1999. p. 383-407.

SILVA, A. R.; JULIATTI, F. C. Esporulação de *Diplodia maydis* e *Diplodia macrospora* em diferentes meios de cultura. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 21, n. 3, p. 127-131, 2005