

Cultivo *in vitro* de *Cephaleuros virescens* sob adição de hormônios

Luana Martins Pires^{1*}(IC), Marina Gabriela Marques¹(IC), Thiago Alves Santos de Oliveira²(PQ), Elisabeth Amélia Alves Duarte²(PQ), Daniel Diego Costa Carvalho³(PQ)

¹Universidade Estadual de Goiás, Ipameri, Goiás. ²Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA. ³Universidade Estadual de Goiás, Ipameri, Goiás.
*luanna_martinspires@hotmail.com

Resumo: A falha frequente na obtenção de um bom rendimento nos cultivos de algas parasitas de plantas em meio de cultura pode ser devido a um conhecimento limitado das necessidades nutricionais desse microrganismo. Objetivou-se neste trabalho avaliar o crescimento *in vitro* de *Cephaleuros virescens* em diferentes meios de cultura e sob o efeito de hormônios. Para tanto, discos de ágar contendo micélio do isolado H-27-01 de *C. virescens*, mantidos em meio básico de Bold (MBB) foram repicados para os meios MBB, meio extrato da folha do hospedeiro agarizado (EFH), Meio Bristol e meio Trebouxia. Em seguida as placas foram mantidas a 25°C e fotoperíodo de 12 h, onde foram tomadas as medidas de diâmetro das colônias do 1º ao 4º dia. Além disso, outros dois experimentos simultâneos foram realizados com os mesmos tratamentos, porém com a adição de 150 mg L⁻¹ de AIA e 150 mg L⁻¹ de GA₃. O meio de cultura que proporcionou maior crescimento micelial foi o meio Trebouxia, independente do uso de hormônio. O meio MBB apresentou pior desempenho em todas as avaliações.

Palavras-chave: Mancha de algas. Mangueira. Fisiologia de algas.

Introdução

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, possuindo um alto consumo interno, especialmente pela melhoria de renda dos brasileiros, com uma colheita que excede 40 milhões de toneladas anuais (Anuário Brasileiro de Fruticultura, 2013). De janeiro a novembro de 2014, o volume de manga exportado foi de 120,3 mil toneladas, 8% superior ao ano de 2013. Em receita, o total soma US\$ 146,5 milhões, 9,1% superior em comparação a 2013 (Hortifruti Brasil, 2015). Porém, são muitos os problemas encontrados na cadeia produtiva desta cultura, que em muitos casos são limitantes a sua exploração comercial tendo em vista as perdas qualitativas e quantitativas, como as doenças causadas por microrganismos (SALES JÚNIOR et al., 2004).

Em se tratando desses organismos, pode-se citar as algas do gênero *Cephaleuros*, principalmente por ser amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais do mundo (NELSON, 2008; GOKHALE & SHAIKH, 2012). Segundo Malagi et al. (2011), no Brasil a mancha de alga já teve incidência relatada nas culturas frutíferas, tais como o abacate, acerola, caju, goiaba, citros e manga. A alga causa danos consideráveis quando sob condições de umidade e temperatura elevadas, preferencialmente em ambientes que possibilitam a manutenção de filme de água na superfície das folhas, o que é necessário para a sua mobilidade e seu desenvolvimento (POLTRONIERIL et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2016).

A falha frequente na obtenção de um bom rendimento nos cultivos de algas parasitas de plantas em meio de cultura pode ser devido a um conhecimento limitado das necessidades nutricionais desse organismo, visto que meios contendo carbono e nitrato ou até hormônios são os mais apropriados para o crescimento das algas (PONMURUGAN et al., 2010; SUTO & OHTANI, 2011). Para exemplificar a importância deste tópico, pode-se citar o trabalho de Malagi et al. (2011), os quais não obtiveram sucesso na multiplicação da alga em meio de cultura BSA (Batata-Sacarose-Ágar). No entanto, Ponmurugan et al. (2010) ao testarem diversos tipos de meios de cultura, obtiveram bons resultados com os meios sintéticos Trebouxia e Bristol, além da indução à germinação de zoósporos pelo emprego do hormônio ácido-3-indolacético (AIA) como componente de alguns dos meios de cultura avaliados.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento de colônias de *Cephaleuros virescens* em diferentes meios de cultura sem e com adição de hormônios: ácido-3-indolacético (AIA) e ácido-3-giberélico (GA₃).

Material e Métodos

Para avaliar o crescimento *in vitro* de *C. virescens* em diferentes meios de cultura, discos de ágar, contendo micélio do isolado H-27-01, pertencente a Coleção de Patógenos de Plantas da Universidade Estadual de Goiás (UEG), mantidos em meio básico de Bold (MBB) foram repicados para os meios (a) MBB [contendo g L⁻¹: (1) 25 g NaNO₃, (2) 2,5 g CaCl₂.2H₂O, (3) 7,5 g MgSO₄.7H₂O, (4) 7,5 g K₂HPO₄, (5) 17,5 g KH₂PO₄, (6) 2,5 g NaCl, (7) 50,0 g EDTA, (8) 31,0 g KOH, (9) 4,98 g

FeSO₄.7H₂O, (10) 11,42 g H₃BO₃, (11) 1 ml H₂SO₄, (12) solução de micronutrientes contendo g L⁻¹: 8,82 g ZnSO₄.7H₂O, 1,44 g MnCl₂.4H₂O, 0,71 g MoO₃, 1,57 g CuSO₄.5H₂O, 0,49 g Co(NO₃)₂.6H₂O; preparado com 10 mL das soluções 1-6, 940 mL de água destilada, 1 mL das soluções 7-12 e 22g de ágar], (b) meio extrato da folha do hospedeiro agarizado (EFH; contendo: 1 L de filtrado a partir de 100 g de folhas de mangueira 'Amrapali' sadias trituradas, 20 g sacarose e 20 g ágar), (c) Meio Bristol [solução Bristol (contendo g L⁻¹: 0,097 g FeCl₂, 0,004 g MnCl₂, 0,005 g ZnCl₂, 0,002 g CaCl₂ e 0,004 g Na₂MoO₄)] e (d) meio Trebouxia (contendo g L⁻¹: 10 g peptona proteose, 20 g glicose, 60 mL solução Bristol). Em seguida as placas foram mantidas a 25°C e fotoperíodo de 12 h, onde foram tomadas as medidas de diâmetro das colônias do 1º ao 4º dia, obtendo-se os valores médios de duas medidas diametralmente opostas. Além disso, outros dois experimentos simultâneos foram realizados com os mesmos tratamentos descritos anteriormente, porém com a adição dos seguintes hormônios: (a) 150 mg L⁻¹ de ácido-3-indol acético (AIA) e (b) 150 mg L⁻¹ de ácido-3-giberélico (GA₃) e subsequente avaliação do crescimento micelial, conjuntamente aos tratamentos sem adição de hormônio, para comparação. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 8 placas de Petri para cada tratamento. Os valores dos diâmetros das colônias foram utilizados para se calcular a área ocupada pelo micélio da alga do 1º ao 4º dia de crescimento. Em seguida, para as análises estatísticas, foi considerada a área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM), a qual foi calculada a partir dos valores diários de área ocupada por micélio, através da fórmula AACCM = $\Sigma [((y_1 + y_2)/2) * (t_2 - t_1)]$, onde y₁ e y₂ são duas avaliações consecutivas realizadas nos tempos t₁ e t₂, respectivamente. Os valores de AACCM foram submetidos ao teste de Scott-Knott (P ≤ 0,05), com auxílio do programa Sisvar 5.3 (FERREIRA, 2011).

Resultados e Discussão

O meio de cultura que proporcionou maior crescimento micelial médio de *C. virescens* foi o meio Trebouxia (AACCM = 73,99), independente do uso de hormônio (Tabela 1). Em seguida, o meio EFH proporcionou o segundo melhor crescimento médio (31,26), exceto na ausência de hormônio (22,75). O meio Bristol foi o que

proporcionou o terceiro melhor crescimento médio (27,56) da alga (média dos três tratamentos: sem hormônio, AIA e GA₃). O meio MBB apresentou pior desempenho em todas as avaliações (sem hormônio, AIA e GA₃), conseqüentemente, proporcionando média estatisticamente inferior aos demais meios (17,77).

Tabela 1. Área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) de *Cephaleuros virescens* em diferentes meios de cultura, sem adição de hormônio e com adição de ácido-3-indolacético (AIA) e ácido giberélico (GA₃). Ipameri, Goiás.

| Meio de cultura | AACCM | | | Média |
|-----------------|--------------|----------|-----------------|---------|
| | Sem hormônio | AIA | GA ₃ | |
| MBB | 26,39 cA | 14,97 dB | 11,95 dB | 17,77 d |
| EFH | 22,75 cC | 38,96 bA | 32,27 bB | 31,26 b |
| Bristol | 35,21 bA | 22,61 cB | 24,86 cB | 27,56 c |
| Trebouxia | 85,29 aA | 74,04 aB | 62,63 aC | 73,99 a |
| CV | 11,69% | 12,22% | 13,26% | 11,78% |
| Média | 42,41 A | 37,64 B | 32,95 C | - |

Ao se comparar se a adição de hormônio interfere com o crescimento micelial de *C. virescens*, verificou-se que a ausência de hormônio, em média, proporcionou melhor crescimento micelial da alga (42,41). O meio EFH foi a única exceção, exibindo aumento de AACCM quando a adição de hormônios. Ao se comparar os hormônios, a adição de AIA aos meios de cultivo proporcionou maior valor médio de AACCM, exceto nos meios MBB e Bristol, os quais foram indiferentes quanto ao tipo de hormônio utilizado.

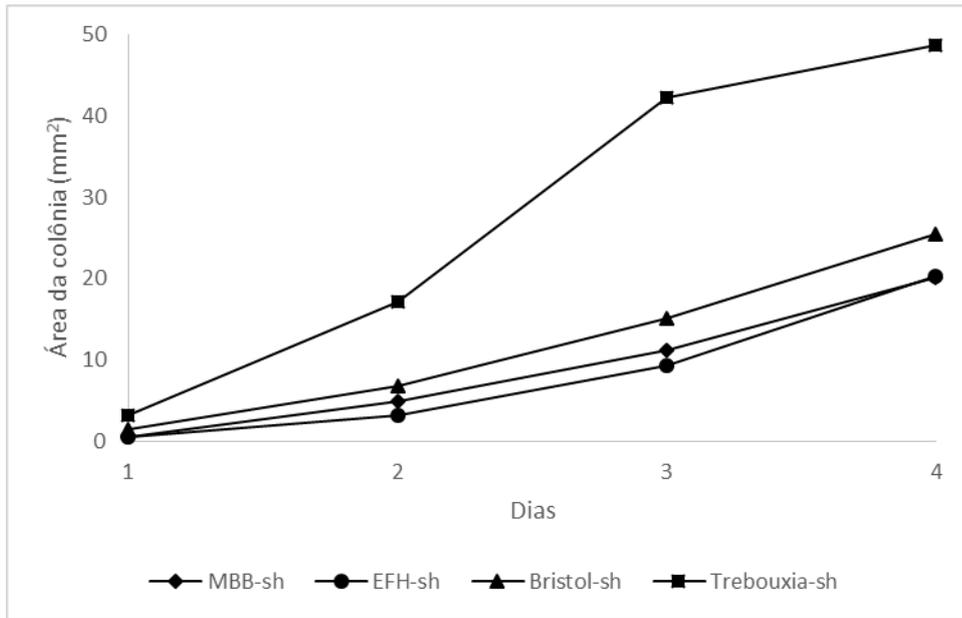


Figura 1. Modelos de crescimento micelial de *Cephaleuros virescens* em diferentes meios de cultura sem adição de hormônio.

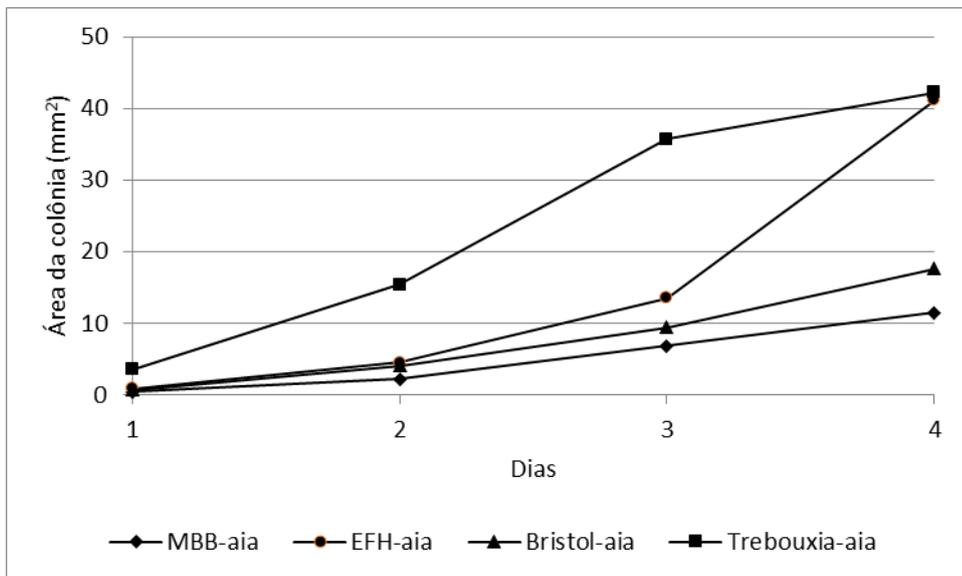


Figura 2. Modelos de crescimento micelial de *Cephaleuros virescens* em diferentes meios de cultura com adição de hormônio AIA.

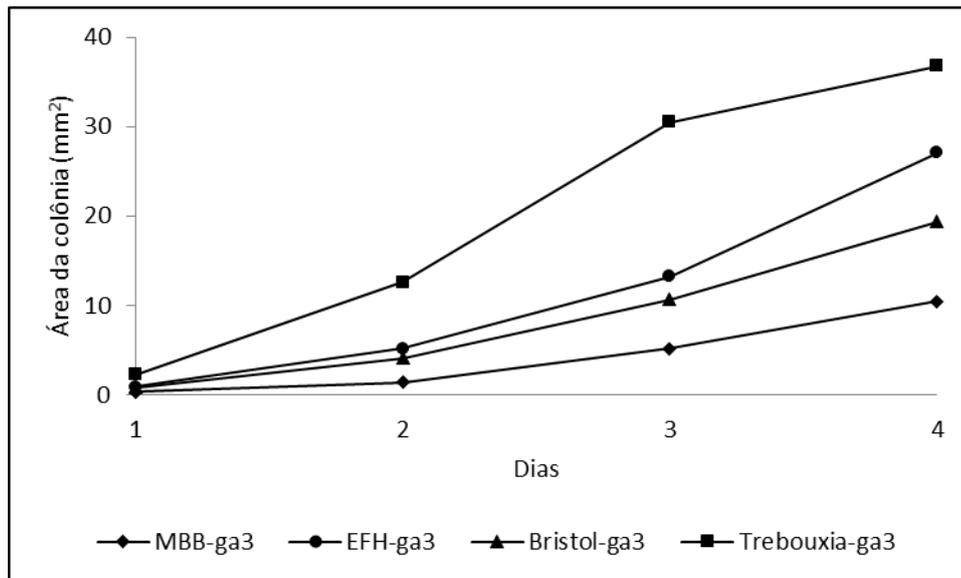


Figura 3. Modelos de crescimento micelial de *Cephaleuros virescens* em diferentes meios de cultura com adição de hormônio GA3.

O meio de cultura que proporcionou melhor crescimento micelial médio de *C. virescens* (AACCM) foi o meio Trebouxia, independente do uso de hormônio. Uma explicação para tal evento reside no fato de que este meio sintético é o meio mais completo dentre os meios avaliados, fornecendo nutrientes essenciais (fósforo, cálcio, magnésio, boro, cobre e zinco) para o desenvolvimento de microalgas (PONMURUGAN et al., 2010). Adicionalmente, Ren et al., (2013) preconizou que o meio Trebouxia fornece nitrogênio por meio da Peptona proteose, o qual é um nutriente essencial ao crescimento de algas. Em estudos recente, Ponmurugan et al., (2010) testaram diferentes meios de cultura, sintéticos e naturais, para o crescimento *in vitro* de *C. parasiticus* e, de forma análoga, obtiveram crescimento acentuado em meio Trebouxia. Um crescimento micelial rápido é importante, uma vez que reduz os riscos de contaminação na cultura pura do microrganismo (SALES CAMPOS e ANDRADE, 2010).

O MBB é um meio que possui mais nutrientes (micronutrientes e macronutrientes) comparado aos demais meios, porém teve o pior desempenho em relação ao crescimento da colônia de *C. virescens*. Isso pode estar relacionado ao fato de não se ter fornecido luminosidade constante no experimento, pois quando se mantém em luminosidade constante mais nutrientes são requeridos para suprir as necessidades fisiológicas de *C. virescens* e manter uma melhor eficiência fotossintética, gerando assim um maior crescimento da alga em condições *in vitro*

(OLIVEIRA et al, 2015). Pode-se inferir também ao fato de que o MBB é um dos meios mais completos porém mais sintéticos também, e a alga se desenvolve melhor em meios menos complexos e mais próximos de condições naturais onde elas se encontram (meios não sintéticos).

A ausência de hormônio, em média, proporcionou melhor crescimento micelial da alga. Neste campo de pesquisa, ainda existem poucos estudos relacionados ao uso de hormônios para indução ao crescimento e reprodução de algas. A maioria dos autores relacionam a indução de hormônios à estimulação de formação de gametângio e de zoósporos e não ao crescimento micelial da alga. Chowdary (1969) reportaram que esporângios e gametângios foram produzidos em *C. virescens* quando auxinas (ácido indolil-3-acético, indolil-3-butírico e indolil-3-propionico) foram adicionadas ao meio de cultura.

Considerações Finais

- 1 - Quando cultivada no meio Trebouxia, independente de uso de hormônios, obteve-se melhor crescimento *in vitro* de *C. virescens*.
- 2 - O MBB teve o pior desempenho em todas as avaliações comparado com os demais, sugerindo que este o isolado H-27-01 de *C. virescens* prefere meios naturais à meios sintéticos.
- 3 - A adição de hormônios não teve um resultado significativo para o crescimento da alga, evidenciando o papel destes apenas nos processos de gametogênese.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Estadual de Goiás (UEG) por uma bolsa de iniciação científica e ao Programa de Bolsa de Incentivo à Pesquisa e Produção Científica (PROBIP) da UEG por uma bolsa de produtividade em pesquisa.

Referências

ANÚARIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2013, 136p.

CHOWDARY, Y.B.K. Induction of reproductive organs in *Cephaleuros virescens*. **Indian Journal Microbiology**, v.3, p.153-158, 1969.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, p.1039-1042, 2011.

GOKHALE, M. V.; SHAIKH, S. S. Host range of a parasitic alga *Cephaleuros virescens* kunz. Ex Fri. from Maharashtra state, India. **Plant Sciences Feed**. v.12, p.1-4, 2012.

HORTIFRUTI BRASIL. **Seca afeta produção, mas clima anima**. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/hfbrasil/edicoes/141/manga.pdf>>. Acesso em: 04 de fevereiro de 2015.

MALAGI, G.; SANTOS, I.; MAZARO, S.M.; GUGINSKI, C.A. Detection of algal leaf spot (*Cephaleuros virescens* Kunze) in citrus in Paraná State. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.17, p.148-152, 2011.

NELSON, S. *Cephaleuros* Species, the plant-parasitic Green algae. **Plant Disease**, v.43, p.1-6, 2008.

OLIVEIRA, N. N.; MARQUES, O, G, B.; RIBEIRO, D. M.; FONSECA, G. G. Cinética de crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana* em diferentes meios com fotoperíodo de 24 horas. Goiânia: Enepe 2015 – Universidade Federal de Goiás. **Anais.....** n.9. p.1, 2015.

POLTRONIERIL, T.; BENCHIMOL, R.L.; VERZIGNASSI, J.R.; CARVALHO, E.A. Alga causando necrose foliar em helicônia no Pará. **Summa Phytopathologica**, v.39, p.139-139, 2013.

PONMURUGAN, P.; SARAVANAM, D.; RAMYA, M. Culture and biochemical analysis of a tea algal pathogen, *Cephaleuros parasiticus*. **Journal of Phycology**, v.46, p.1017-1023, 2010.

REN, H.; LIU, B.; MA, C.; ZHAO, L.; REN, N. A new lipid-rich microalga *Scenedesmus* sp. strain R-16 isolated using Nile red staining: effects of carbon and nitrogen sources and initial pH on the biomass and lipid production. **Biotechnology for Biofuels**, v.6, p.143, 2013.

SALES JÚNIOR, R.; COSTA, F.M.; MARINHO, R.E.M.; NUNES, G.H.S.; AMARO FILHO, J.; MIRANDA, V.S. The use of azoxystrobin in the control of mango anthracnosis. **Fitopatologia brasileira**, v.29, n.2, p.193-196, 2004.

SUTO, Y.; OTANI, S. Morphological features and chromosome numbers in cultures of five *Cephaleuros* species (Trentepohliaceae, Chlorophyta) from Japan. **Phycological Research**, v.59, p.42-51, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 4. ed. Sunderland: Sinauer, 2006. 764 p

VASCONCELOS, C.V.; PEREIRA, F.T.; GALVAO, C.S.; CARVALHO, D.D.C. Occurrence of algal leaf spot (*Cephaleuros virescens* Kunze) on avocado in Goiás State, Brazil. **Summa Phytopathologica**, v.41, n.1, p.108, 2016.