

SALINIDADE E POTENCIAL OSMÓTICO NO CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO* DE OITO ESPÉCIES DE *Botryosphaeriaceae*

GUSTAVO RODRIGUES COELHO^{1*}; LEONARDO APARECIDO BRANDÃO DA SILVA²;
CATARINA DOURADO OLIVEIRA³; ALEXANDRE SANDRI CAPUCHO⁴

¹Graduando em Agronomia, CNPq, UNIVASF, Petrolina-PE, gustavorodc@gmail.com;

²Graduando em Agronomia, CNPq, UNIVASF, Petrolina-PE, plant.pathology321@gmail.com;

³Engenheira Agrônoma, Mestranda em Produção Vegetal, UNIVASF, Petrolina-PE, cat.dourado@gmail.com;

⁴Dr. Prof. Adjunto, UNIVASF, Petrolina-PE, alexandre.capucho@univasf.com.br

Apresentado no
Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia – CONTECC'2018
21 a 24 de agosto de 2018 – Maceió-AL, Brasil

RESUMO: O gênero *Lasiodiplodia* pertence à família *Botryosphaeriaceae* e engloba uma gama de fungos que são patógenos de plantas. Esses fungos apresentam salinidade e o estresse hídrico como condições favoráveis ao desenvolvimento de doenças em plantas. Objetivou-se com este trabalho avaliar a influência *in vitro* da salinidade e do potencial osmótico no crescimento micelial de oito espécies de *Lasiodiplodia* spp. Para a avaliação da salinidade foram utilizados concentrações 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7% e 8% de NaCl. Para avaliar o efeito do potencial osmótico, os fungos foram submetidos aos potenciais 0 MPa (controle), - 1,0 MPa, - 2,0 MPa, - 3,0 MPa, - 4,0 MPa e - 5,0 MPa. Foi observado o crescimento dos fungos em todos os potenciais osmóticos e apenas um isolado não cresceu a partir de 6% de NaCl.

PALAVRAS-CHAVE: *Lasiodiplodia*; estresse hídrico; cloreto de sódio.

SALINITY AND OSMOTIC POTENTIAL IN *IN VITRO* MYCELIAL GROWTH OF EIGHT SPECIES OF *Botryosphaeriaceae*

ABSTRACT: The genus *Lasiodiplodia* belongs to the family *Botryosphaeriaceae* and encompasses a range of fungi that are plant pathogens. These fungi present salinity and water stress as favorable conditions for the development of plant diseases. The objective of this work was to evaluate the *in vitro* influence of salinity and osmotic potential on the mycelial growth of eight species of *Lasiodiplodia* spp. For the evaluation of salinity, concentrations 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7% and 8% of NaCl were used. To evaluate the effect of the osmotic potential, the fungi were submitted to the potential 0 MPa (control), - 1.0 MPa, - 2.0 MPa, - 3.0 MPa, - 4.0 MPa and - 5.0 MPa. Fungus growth was observed in all osmotic potentials and only one isolate did not grow from 6% NaCl.

KEYWORDS: *Lasiodiplodia*; hydric stress; sodium chloride.

INTRODUÇÃO

A família *Botryosphaeriaceae* engloba uma gama de fungos que são patógenos de plantas, principalmente em hospedeiros lenhosos. Eles são encontrados em todas as regiões geográficas e áreas climáticas do mundo, com exceção das regiões polares (Phillips et al., 2013).

Dentre as espécies pertencentes a esta família, as do gênero *Lasiodiplodia* apresentam grande importância agrônoma por causar doenças em diversas culturas, como por exemplo, na videira (*Vitis* spp.), mangueira (*Mangifera indica* L.), algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.), citros (*Citrus* spp.), coqueiro (*Cocos nucifera* L.), meloeiro (*Cucumis melo* L.), roseira (*Rosa* spp.), aceroleira (*Malpighia emarginata*), dentre outras (Batista et al., 2010).

As condições favoráveis ao desenvolvimento de doenças causadas por esses fungos são diversas. São fungos cosmopolitas, polívoros, com pouca especialização patogênica e estão, geralmente, associadas a plantas sob estresse (Pereira et al., 2006). Condições de estresse que podem favorecer a vulnerabilidade das plantas a estes fungos, têm-se a salinidade e o estresse hídrico, além de

outros. Estes fatores promovem a inibição do crescimento das plantas sob condições salinas tanto pelo déficit hídrico, provocado pela redução do potencial osmótico do solo, quanto pelo efeito causado pelo acúmulo de determinados íons no protoplasma. Este acúmulo pode causar problemas de toxicidade iônica, deficiências nutricionais ou ambos (Munns, 2005). Esses fatores, juntamente com a pressão biológica de patógenos e pragas expandindo sua faixa geográfica, são todos elementos que favorecem o desenvolvimento de doenças relacionadas a *Botryosphaeriaceae* (Desprez-Loustau et al., 2006).

Nesse sentido, o presente trabalho objetivou avaliar a influência *in vitro* da salinidade e do potencial osmótico no crescimento micelial de oito espécies de *Lasiodiplodia* spp.

MATERIAL E MÉTODOS

As espécies utilizadas foram identificadas por Cabral (2017), a qual coletou e realizou a identificação molecular das espécies seguindo a metodologia de Alves et al. (2008).

Inicialmente, a patogenicidade de oito isolados de *Lasiodiplodia* spp. pertencentes a cada uma das espécies identificadas foi restaurada. Para isso, cada isolado foi repicado para placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar). A seguir, as placas foram incubadas em câmara tipo BOD por 7 dias a 25 °C no escuro. Após esse procedimento, os isolados foram inoculados em mudas de aceroleira a partir de discos de micélio (4,76 mm de diâmetro), os quais foram colocados em pequenos cortes em bisel realizados em ramos de mudas de aceroleira cv. Junko e, após a inserção do disco, foi colocado um pedaço de algodão umedecido para promover um ambiente favorável ao desenvolvimento da doença. Após o aparecimento dos sintomas, fragmentos do caule foram usados para reisolar cada isolado do patógeno em BDA nas mesmas condições de incubação.

A partir dos isolados com a sua patogenicidade restaurada, os mesmos foram usados para avaliar o efeito da salinidade no crescimento dos fungos *in vitro*. O delineamento experimental usado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial, com cinco repetições. Discos de micélio foram retirados de placas de Petri com 7 dias de incubação a 25 °C no escuro. Posteriormente, cada isolado foi transferido para o centro de placas de Petri contendo BDA suplementado com 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8% (peso/volume) de cloreto de sódio (NaCl), os quais consistiram no fator 1 e os oito isolados de *Lasiodiplodia* spp. consistiram no fator 2. A unidade experimental foi constituída por cada placa de Petri. As placas foram incubadas em câmara tipo BOD no escuro a 25 °C e o diâmetro da colônia, em duas posições ortogonais, foram medidos com um auxílio de um paquímetro digital após 72 horas da inoculação.

Para a avaliação do crescimento dos isolados *in vitro* submetidos a diferentes potenciais hídricos foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial, com cinco repetições. A unidade experimental foi constituída de cada placa de Petri. O fator 1 foram: 0 MPa (controle); -1,0 MPa; -2,0 MPa; -3,0 MPa, -4,0 MPa e -5,0 MPa. O fator 2 foram oito espécies de *Lasiodiplodia* spp. Os discos de micélio foram retirados de placas com 7 dias de incubação, como nas condições anteriores. Posteriormente, cada isolado foi transferido para o centro de placas de Petri com o respectivo potencial osmótico (foi utilizado cloreto de potássio para alcançar o potencial osmótico desejado). As placas foram incubadas em câmara tipo BOD no escuro a 25 °C e os diâmetros, em milímetros, das colônias, em duas posições ortogonais, foram medidos com um auxílio de um paquímetro digital após 72 horas de incubação.

Os dados foram coletados e foi realizada a análise de variância e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Scott-Knot ($P \leq 0,05$), com o auxílio do Sisvar versão 5.4. Além disso, foram feitos gráficos de dispersão com curva de regressão, com o auxílio do SigmaPlot 10.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto à salinidade, os isolados cresceram conforme mostrado na Figura 1. É possível observar, analisando os gráficos, que com o aumento da concentração salina ocorre diminuição do crescimento micelial. Na tabela 1, observa-se que apenas o isolado 19 não apresentou diferenças significativas entre as concentrações de 0% e 1%; e o isolado 15 não apresentou crescimento micelial a partir de 6% de NaCl.

É possível constatar, também, que o isolado 19 demonstra uma possível adaptabilidade em alguns níveis de sal; e que, mesmo a concentração salina do ambiente encontrando-se dentro do suportado pela cultura, os fungos podem vir a crescer e causar doença na planta.

Figura 1. Gráficos da influência da salinidade no crescimento micelial do agente causal da morte descendente causada por *Lasiodiplodia* spp.

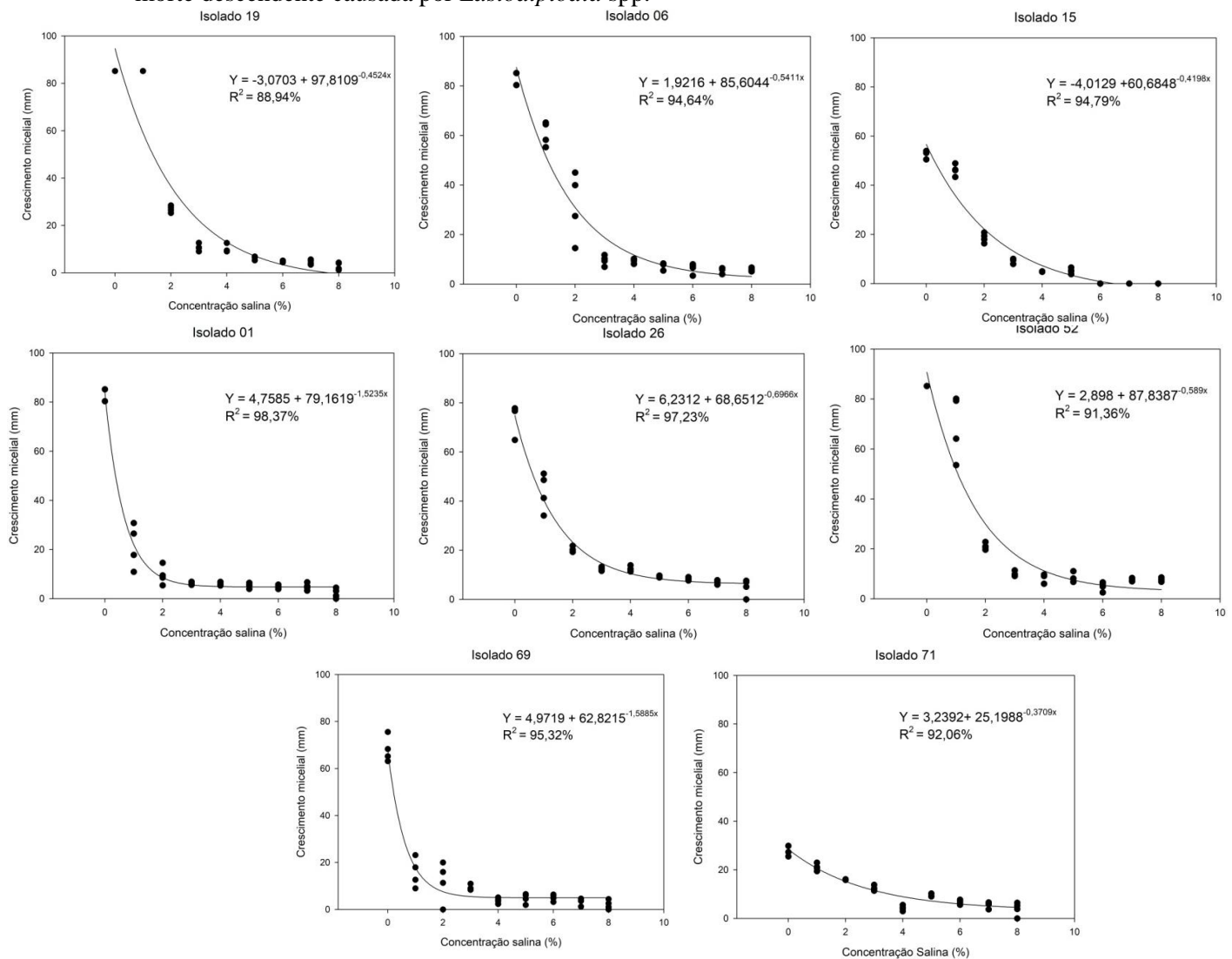


Tabela 1. Análise de variância do crescimento micelial, em milímetros, em função da salinidade dos oito isolados de *Botryosphaeriaceae*.

Concentração Salina	Isolados							
	01	06	15	19	26	52	69	71
0%	85,2 a	80,34 a	52,74 a	85,20 a	74,09 a	85,20 a	68,02 a	28,08 a
1%	27,78 b	31,94 b	46,17 b	85,20 a	43,76 b	69,25 b	15,65 b	21,04 b
2%	9,26 c	12,49 c	18,60 c	19,97 b	20,16 c	21,00 c	11,79 c	15,99 c
3%	6,97 c	6,62 d	9,38 d	8,19 c	12,51 d	9,97 d	9,30 c	12,45 d
4%	6,64 c	6,05 d	5,12 e	7,22 c	12,42 d	8,53 d	3,81 d	9,60 d
5%	5,93 c	3,84 d	4,78 e	3,94 d	9,33 e	8,49 d	4,73 d	6,71 e
6%	5,47 c	2,64 d	0,00 f	2,62 d	8,26 e	6,32 d	5,08 d	5,52 e
7%	5,72 c	3,19 d	0,00 f	2,59 d	7,13 e	5,80 d	3,26 d	4,24 e
8%	2,77 c	2,23 d	0,00 f	1,32 d	4,92 e	7,77 d	1,99 d	3,88 e

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knot ($P \leq 0,05$).

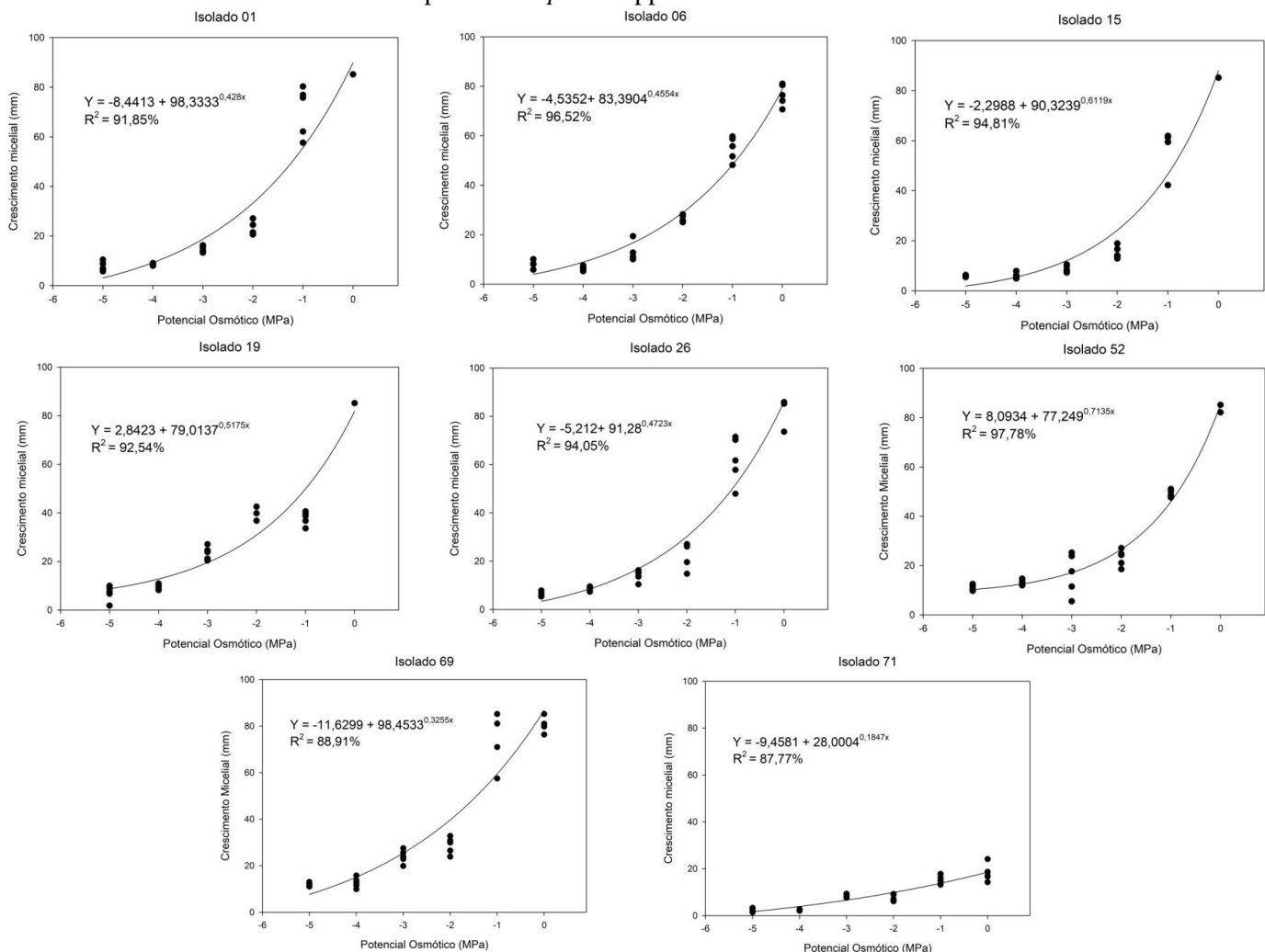
O isolado 01 não apresentou diferenças significativas entre as concentrações a partir de 2%. Isso demonstra que o ambiente ausente em salinidade promove melhores condições para o crescimento do fungo. À medida que o sal aumenta de concentração, o crescimento micelial é diminuído. O mesmo ocorre com o isolado 06 e 52, entre os tratamentos a partir de 3%; com o isolado 26 e 71 nas

concentrações a partir de 5%; e com o isolado 69 nas concentrações a partir de 4%. Todos estes isolados apresentam crescimento, nas condições do experimento, na concentração de 8% mantendo um menor crescimento em relação à testemunha.

Resultado semelhante foi encontrado por Arafat et al. (2013) que estudaram o efeito da salinidade da água de irrigação na redução do crescimento de *Lasiodiplodia theobromae* identificando que a concentração de sal capaz de elevar a condutividade elétrica da água de irrigação para 15,63 dS/m² foi capaz de reduzir o crescimento do fungo em 17,03%.

Quanto ao potencial osmótico, o crescimento dos isolados se deu como mostrado na figura 2. Na tabela 2 encontram-se os resultados do teste de média para cada isolado. Foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos e os resultados demonstram que, à medida que o potencial osmótico diminui, há redução do crescimento micelial.

Figura 2. Gráficos da influência do potencial osmótico no crescimento micelial do agente causal da morte descendente causada por *Lasiodiplodia* spp.



Todos os isolados apresentaram menor crescimento micelial no potencial osmótico de -4,0 MPa, e este não diferiu do potencial -5,0 MPa e o isolado 71 não apresentou diferenças significativas entre os potenciais 0,0 e -1,0 MPa, apresentando certa resistência ao estresse hídrico, nas condições deste experimento.

Os resultados mostram que os isolados conseguem se desenvolver submetidos a diferentes potenciais osmóticos *in vitro*, entretanto, à medida que o potencial osmótico diminui, há redução no crescimento.

A influência do potencial osmótico no crescimento e desenvolvimento dos fungos foi estudada por Coutinho et al. (2001), onde foi observado que a restrição hídrica do meio BDA, com a adição de NaCl, KCl ou manitol, nos potenciais de -0,6 e -0,7 MPa, não afetou o crescimento micelial de

Drechslera oryzae, *Gerlachia oryzae*, *Phoma sorghina*, *Pyricularia grisea*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Rhizoctonia solani*. Além disso, concluíram que o potencial osmótico de -0,7MPa do meio ágar-água induzido por NaCl afeta adversamente o crescimento micelial *in vitro* do fungo *Macrophomina phaseolina*.

Tabela 2. Análise de variância do crescimento micelial, em milímetros, em função do potencial osmótico dos oito isolados de *Botryosphaeriaceae*.

Potencial Osmótico	Isolados							
	Iso 01	Iso 06	Iso 15	Iso 19	Iso 26	Iso 52	Iso 69	Iso 71
0 MPa	85,2a a	76,56 a	85,20 a	85,20 a	82,88 a	84,59 a	81,51 a	18,12 a
-1,0 MPa	70,56 b	54,81 b	57,32 b	40,87 b	61,81 b	49,16 b	75,17 b	15,17 a
-2,0 MPa	22,98 c	21,34 c	15,26 c	37,97 b	22,83 c	23,15 c	28,80 c	8,48 b
-3,0 MPa	8,65 d	12,71 d	8,82 d	23,44 c	8,37 d	16,74 d	23,99 c	8,07 b
-4,0 MPa	8,58 d	8,47 d	5,98 d	9,37 d	6,47 d	13,07 d	12,75 d	2,31 c
-5,0 MPa	7,73 d	6,41 d	5,95 d	7,02 d	5,31 d	11,20 d	12,06 d	2,30 c

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knot ($P \leq 0,05$).

CONCLUSÃO

Os isolados conseguem crescer, *in vitro*, na presença de sais e sob diferentes potenciais osmóticos, entretanto, a adição de sal e a redução do potencial osmótico do meio promovem a diminuição do crescimento micelial, nas condições do experimento.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq/UNIVASF pela concessão de bolsa de IC ao primeiro autor. Este projeto foi financiado pela FACEPE (APQ-0243-5.01/14) e CNPq (445.963/2014-0).

REFERÊNCIAS

- Alves, A.; Crous, P. W.; Correia, A.; Phillips, A. J. L. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. Fungal diversity, v.28, p.1-13, 2008.
- Arafat, K. H.; Mohamad, A. M.; Elsharabasy, S. Influence of environmental conditions, salinity and root exudates on incidence and disease severity of lasiodiplodia theobromae that caused root rot of date palm offshoots and biocontrolling. The Journal of Biological Chemistry, v.8, n.1, p.73-91, 2013.
- Batista, D. da C.; Costa, V. S. O.; Barbosa, M. A. G.; Terao, D.; Silva, F. M.; Tavares, S. C. C. H. Manejo Integrado de *Lasiodiplodia theobromae* em Videira no Submédio do Vale do São Francisco. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. (Circular Técnica CTE 91).
- Cabral, P. G. C. Botryosphaeriales associated with acerola dieback and necrotic symptoms on plant species near commercial orchards in the Caatinga biome of Northeastern Brazil. Viçosa: UFV, 2017. 100f. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Departamento de Fitopatologia. Universidade Federal de Viçosa.
- Coutinho, W. M.; Machado, J. C.; Vieira, M; G; G; C.; Guimarães, R. M.; Ferreira, D. F. Uso da restrição hídrica na inibição ou retardamento da germinação de sementes de arroz e feijão submetidas ao teste de sanidade em meio ágar-água. Revista Brasileira de Sementes, v.23, n.2, p.127-135, 2001.
- Desprez-Loustau, M. L.; Marcais B.; Nageleisen, L. M.; Piou, D.; Vannini, A. Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. Annals of Forest Science, v.63, n.6, p.597-612, 2006.
- Munns, R. Genes and salt tolerance: bringing them together. New Phytologist, v. 167, n.03, p.45-663, 2005.
- Pereira, A. L.; Silva, G. S.; Ribeiro, V. Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. Fitopatologia Brasileira, v.31, n.6, p.572-578, 2006.
- Phillips, A. J. L.; Alves, A.; Abdollahzadeh, J.; Slippers, B.; Wingfield, M. J.; Groenewald, J. Z.; Crous, P. W. The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. Studies in Mycology v.76, p.51-167, 2013.