



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO - UFMA
CENTRO DE CIÊNCIAS DE CHAPADINHA - CCCh
CURSO DE AGRONOMIA

ANA ESTER MORAIS ALVES

MEIOS DE CULTURAS NATURAIS PARA CRESCIMENTO DE *Sclerotium rolfsii*

CHAPADINHA – MA
2023

ANA ESTER MORAIS ALVES

MEIOS DE CULTURAS NATURAIS PARA CRESCIMENTO DE *Sclerotium rolfsii*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação de Agronomia do Centro de Ciências de Chapadinha, da Universidade Federal do Maranhão – UFMA, para obtenção do título de Agrônoma.

Orientadora: Profa. Dra. Izumy Pinheiro Doihara.

Coorientador: Prof. Dr. James Werllen de Jesus Azevedo.

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Morais Alves, Ana Ester.

MEIOS DE CULTURAS NATURAIS PARA CRESCIMENTO DE
Sclerotium rolfsii / Ana Ester Moraes Alves. - 2023.
32 p.

Coorientador(a): James Werllen de Jesus Azevedo.
Orientador(a): Izumy Pinheiro Doihara.

Monografia (Graduação) - Curso de Agronomia,
Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências de
Chapadinha, 2023.

1. Fitofungo. 2. Meios naturais. 3. Microrganismos.
I. de Jesus Azevedo, James Werllen. II. Pinheiro
Doihara, Izumy. III. Título.

ANA ESTER MORAIS ALVES

MEIOS DE CULTURAS NATURAIS PARA CRESCIMENTO DE *Sclerotium rolfsii*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação de Agronomia, do Centro de Ciências de Chapadinha, da Universidade Federal do Maranhão – UFMA para obtenção do título de Agrônoma.

Aprovada em: ____/____/____

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª. Dra. Izumy Pinheiro Doihara
Professora / CCCh - Agronomia – UFMA

Prof. Dr. Cláudio Gonçalves da Silva
Professor / CCCh - Biologia – UFMA

Prof. Dr. José Roberto Brito Freitas
Professor /CCCh- Agronomia – UFMA

Tu és o meu Deus; graças te darei!
Ó meu Deus, eu te exaltarei! Deem graças ao Senhor, porque ele é bom;
O seu amor dura para sempre.
Salmos 118:28-29

DEDICATÓRIA

Aos meus pais por terem sido meus melhores amigos, profissionais de excelência e comprometimentos com a responsabilidade social.

“A vida
É luta renhida:
Viver é lutar.
A vida é combate,
Que os fracos abate,
Que os fortes, os bravos
Só pode exaltar.”
(Gonçalves Dias)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela graça da vida, graça do renascimento, amor incondicional e infinita misericórdia.

Ao príncipe da Milícia Celeste, São Miguel Arcanjo, pelo discernimento e força em todos os combates.

Aos anjos pela proteção.

Aos meus amados pais (*in memoriam*), pelo amor envolvido de apoio, proteção e aconselhamento. Pelos princípios cristãos que me direcionaram para o temor a Deus, bondade, generosidade, humildade e gratidão. Pela educação com base no respeito, na honestidade, no compromisso, no trabalho e na responsabilidade, que foram essenciais para formação do meu caráter. Pelo incentivo e disciplina aos estudos, com objetivos no conhecimento, formação acadêmica e independência e a todos os ensinamentos burocráticos que me prepararam com autonomia para a vida. Todo o meu amor!

As minhas fontes de doçura, amor e trabalho, meus avós (*in memoriam*).

Aos meus filhos, por compreenderem minha ausência, por serem tementes a Deus, amorosos e disciplinados com os estudos. Amo vocês!

Ao meu cachorro Conan (*in memoriam*), amigo carinhoso, protetor e fiel. Você estará para sempre em meu coração!

Aos meus queridos amigos de infância e adolescência que estão aqui e aos que já se foram, por estarem ao meu lado, por compartilharem suas alegrias e tristezas, vitórias e derrotas, e principalmente por serem leais a nossa amizade.

Aos amigos dos meus pais, pelo suporte repleto de atenção, apoio, aconselhamento, preocupação, cuidado e amor.

Aos colegas da Universidade Federal do Maranhão que tive parceria nos estudos.

Ao Professor Dr. Cláudio Gonçalves da Silva, pela oportunidade de Estágio, seriedade, humildade, paciência, compreensão, incentivo e principalmente por proporcionar alto nível de conhecimento acadêmico.

A minha Orientadora, Profa. Dra. Izumy Pinheiro Doihara, a qual tive convívio em quatro disciplinas, três estágios e grupo de pesquisa (GEPFITO). Agradeço sua atenção, disponibilidade e paciência ao longo da elaboração do projeto, do experimento e da monografia. Esta foi assistida de serenidade em todos os momentos, positivismo em situações de

preocupação e acompanhamento com dedicação ao explicar cada etapa e correção. Minha gratidão!

Ao meu Co-orientador pelo aceite de convite.

A Banca Examinadora pelo aceite de convite.

A Universidade Federal do Maranhão.

A cidade de Chapadinha, e a cada morador que esteve presente na minha caminhada, vocês deixarão boas recordações.

RESUMO

O objetivo deste Trabalho de Conclusão de Curso é determinar o potencial de crescimento e formação de estruturas de resistência de *Sclerotium rolfsii* em meios de cultura alternativos com adição de caldo de cana-de-açúcar. Os meios de cultura naturais (batata inglesa, macaxeira, abóbora, batata doce, beterraba, banana e cenoura) com adição de caldo de cana-de-açúcar apresentam condições nutricionais satisfatórias para o desenvolvimento de *Sclerotium rolfsii* pois favoreceram um diâmetro de crescimento equivalentes ao meio clássico de BDA sintético para cultivo de fungo fitopatogênico. Não houve desenvolvimento de estrutura de resistência durante o período de desenvolvimento analisado. O experimento foi realizado no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências de Chapadinha da Universidade Federal do Maranhão, Campus de Chapadinha. Com a presença de meios de culturas sólidos que foram preparados com diferentes ingredientes e utilizados para avaliar o crescimento e esporulação do *Sclerotium rolfsii*. Os meios de cultura naturais utilizados no experimento, foram preparados com fruta, tubérculos e/ou raízes tuberosas. Os meios de cultura foram preparados conforme metodologias empregadas para a maioria das constituições de preparo que compreende em medir e pesar os ingredientes, utilizar o caldo do cozimento de legumes, tubérculos e raízes, juntar os ingredientes, adicionar o ágar diluído e submeter ao processo de esterilização em autoclave à 121° C e 1 atm de pressão. Em todos os meios de cultura foi acrescido como fonte de adoçante natural, o caldo de cana-de-açúcar e o ágar para adquirir consistência sólida. O desenvolvimento das colônias nos diferentes meios de cultura foi avaliado medindo as seguintes variáveis: diâmetro de crescimento a cada 24 horas até que a primeira colônia se alcançar o diâmetro total da placa de Petri e a formação das estruturas de resistência. O delineamento experimental que foi utilizado constou de 08 tratamentos e 08 repetições, totalizando 49 unidades experimentais.

Palavras-chave: Fitofungo; Meios naturais; Microrganismos.

ABSTRACT

The objective of this Course Completion Work is to determine the growth potential and formation of resistance structures of *Sclerotium rolfsii* in alternative culture media with the addition of sugar cane juice. Natural culture media (potato, cassava, pumpkin, sweet potato, beetroot, banana and carrot) with the addition of sugar cane juice present satisfactory nutritional conditions for the development of *Sclerotium rolfsii* as they favored a growth diameter equivalent to the classic synthetic PDA medium for cultivating phytopathogenic fungi. There was no development of resistance structure during the analyzed development period. The experiment was carried out at the Phytopathology Laboratory of the Chapadinha Science Center of the Federal University of Maranhão, Chapadinha Campus. With the presence of solid culture media that were prepared with different ingredients and used to evaluate the growth and sporulation of *Sclerotium rolfsii*. The natural culture media used in the experiment were prepared with fruit, tubers and/or tuberous roots. The culture media were prepared according to methodologies used for most preparation preparations, which include measuring and weighing the ingredients, using the broth from cooking vegetables, tubers and roots, combining the ingredients, adding the diluted agar and submitting to the process of sterilization in autoclave at 121° C and 1 ATM pressure. The development of colonies in different culture media was evaluated by measuring the following variables: growth diameter every 24 hours until the first colony reached the full diameter of the Petri dish and the formation of resistance structures. The experimental design that was used consisted of 08 treatments and 08 replications, totaling 49 experimental units.

Keywords: Phytofungus; Natural means; Microorganisms.

LISTA DE TABELA E FIGURA

TABELA 1. Médias do diâmetro de crescimento de colônias de <i>Sclerotium rolfsii</i> a cada 24 horas durante sete dias de avaliação em diferentes meios de culturas naturais com adição de caldo de cana-de-açúcar.....	16
Figura 1. Porcentual do desenvolvimento das colônias de <i>Sclerotium rolfsii</i> em placas de Petri contendo discos de cultivo de meios naturais (batata inglesa, macaxeira, abóbora, batata doce, beterraba, banana e cenoura) com adição de caldo de cana-de-açúcar e o BDA sintético (testemunha) ao longo dos sete dias de avaliação.....	19

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 JUSTIFICATIVA	7
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
3.1 HISTÓRICO SOBRE MEIOS DE CULTURA	8
3.2 CUSTOS DE MATERIAIS	8
3.3 MEIOS DE CULTURA E SUA FINALIDADE	8
3.4 TIPOS DE MEIOS DE CULTURA E METODOLOGIA DE PREPARO	9
4 OBJETIVOS.....	13
4.1 OBJETIVOS GERAL	13
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
5 METODOLOGIA.....	14
5.1 LOCAL DO EXPERIMENTO	14
5.2 MEIOS DE CULTURA	14
5.3 PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA.....	14
5.4 FUNGO CULTIVADO.....	14
5.5 AVALIAÇÃO REALIZADAS	15
5.6 DELINEAMENTO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO	15
5.7 VARIÁVEIS ANALISADAS	15
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	15
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
REFERÊNCIAS.....	21

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de microrganismos, em condições laboratoriais, se dá pela utilização de meios de cultura. Esses podem ser definidos como conjunto de nutrientes necessários para possibilitar a multiplicação ou manutenção dos microrganismos. Existe uma grande variedade de procedimentos e preparações nutricionais utilizadas para induzir tal crescimento, de acordo com as exigências nutritivas e das condições físicas requeridas pelos diversos tipos de fungos (Vieira; Fernandes, 2012).

Podemos encontrar diferentes tipos de meios de culturas no mercado especializado, estes são geralmente do grupo dos sintéticos. Os meios de cultura quanto a sua composição podem ser sintéticos, semissintéticos, naturais ou seletivos. Nos sintéticos todos os componentes do meio possuem composição conhecida. A princípio, todo meio sintético é líquido, como meio Czapek e de outros. Os semissintéticos não se conhecem a composição de alguns componentes do meio, como peptona-dextrose-ágar (PDA) e outros. Os naturais são a base de extratos e decocções de material natural de composição desconhecida, como extrato de levedura, extrato de malte, extrato de carne, batata, cenoura, aveia, arroz, milho e outros. Os seletivos contêm substâncias (vitaminas, antibióticos e, ou, fungicidas, etc.) que favorecem o desenvolvimento do organismo que se deseja cultivar e inibem o de outros indesejáveis (Alfenas; Mafia, 2007).

Os meios de cultivo devem conter as substâncias exigidas pelos microrganismos para o seu crescimento e multiplicação. Para que os microrganismos possam realizar a síntese de seus próprios constituintes celulares, os meios devem dispor de fontes de carbono (proteínas e açúcares), fontes de nitrogênio (peptonas) e fontes de energia. São também necessários alguns sais minerais, vitaminas e outras substâncias que favoreçam o seu crescimento (UFRGS, 2013).

É importante ressaltar que através da utilização de algum ingrediente, é possível e aplicação de um determinado componente, é possível verificar se ele propiciou melhor desenvolvimento ou não. Avaliando simplesmente o crescimento e a esporulação dos microrganismos. Dessa forma, definindo quais as vantagens e desvantagens da presença do material de estudo no seu produto final. O uso dos meios de cultura em um estudo, auxiliam na identificação dos microrganismos que podem provocar infecções, alergias e, até mesmo, a contaminação da água ou alimentos. Por isso, uso dos meios de culturas são de fundamental importância para a estudos de diagnose de doenças, patogenicidade e finalidades de uso e outras análises. Mas, além das condições que podem ser adaptadas para o cultivo de microrganismos,

ainda existe uma grande variedade de tipos de meios de cultura já descritos e muitos outros a serem descobertos (BASTOS, 2019).

2 JUSTIFICATIVA

Os meios de culturas são substratos utilizados para o cultivo de microrganismos visando estudos, práticas e ensaios laboratoriais. Os meios clássicos não proporcionam um crescimento e multiplicação adequada, o que requer na maioria das composições a adição de componentes nutritivos existentes ou formular novas soluções para os meios de cultura (UFRGS, 2013).

Aspectos como temperatura e luminosidade nos meios de cultura determinam a quantidade e qualidade do crescimento micelial e esporulação dos fitopatógenos. As condições favoráveis para o crescimento não são consideradas as mesmas para a esporulação (Silva; Teixeira, 2012).

Os fungos fitopatogênicos podem sobreviver por vários anos por meios de suas estruturas de resistência, causando perdas em muitas culturas, por vezes, inviabilizando o pleno aproveitamento (Ambrósio et al., 2009). Uma identificação precisa de fungos fitopatogênicos é um passo chave para estudos de diversidade e epidemiologia, assim como no desenvolvimento de estratégias efetivas de controle de fitodoenças (Faria; Inácio, 2023).

Verifica-se na literatura que há uma ênfase nos meios de culturas sintéticos e semissintéticos. Mediante a essa informação, não há estudos relacionadas ao uso de meio de culturas naturais. Que pode gerar menores custos com seu emprego em pesquisas acadêmicas. Neste sentido, este trabalho de pesquisa tem como importância fundamental pesquisar e testar componentes em formulações de meios de cultura com potencial para crescimento e esporulação de fitofungos e com menor custo no preparo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Histórico sobre meios de cultura

Em 1860, o químico e microbiologista Louis Pasteur (1822-1895) foi um dos primeiros a utilizar em laboratório meios de cultura líquidos para o crescimento de bactérias. Para estudar o mecanismo da fermentação alcoólica, Pasteur criou um meio de cultura com leveduras, cinzas, açúcar e sais de amônio. Esse meio oferecia as condições ideais para o desenvolvimento de microrganismos: o nitrogênio, suprido pelos sais de amônio; a fonte de carbono, oferecida pelo açúcar; e as vitaminas, providas pelas cinzas. A partir dos resultados obtidos, Pasteur concluiu que a fermentação era catalisada por microrganismos, ao contrário do que se acreditava até então de que as células de levedura presentes no caldo eram alguma substância química resultante da fermentação (Freitas, 2022).

3.2 Custos de materiais para preparo do meio de cultura

Reagentes e equipamentos são necessários para a experimentação em laboratório, e mais especificamente, para a realização de práticas que envolvem o isolamento e identificação preliminar de fungos, e os custos relativamente altos para a montagem de infraestrutura, o que inviabiliza muitas vezes a realização de experimentos (Ono et al., 2020).

As metodologias permitem o estudo e avaliação em trabalhos de pesquisa, estes são importantes na geração de conhecimentos sobre as técnicas e meios de cultura que colabore de forma dinâmica nos trabalhos desenvolvidos (Nascimento et al., 2014). Na constante busca de alternativas de utilização laboratorial, tem-se verificado que muitos extratos de culturas que têm sido usados com sucesso em experimentos (Carminate, 2015).

3.3 Meios de cultura e sua finalidade

Os meios de cultivo, também chamados de meios de cultura, são substâncias que se destinam ao cultivo de microrganismos no laboratório. Estes contêm uma série de substâncias nutritivas essenciais para o crescimento fúngico, tais como: carboidratos, proteínas, aminoácidos, sais minerais, ácidos graxos e vitaminas, porém, nenhum deles pode ser considerado um substrato ideal (Brasil, 2013).

Os meios de cultura devem atender às exigências nutricionais das espécies a serem cultivadas. A deficiência dos meios de cultura pode ser evidenciada pelo fato de que, até atualmente, não se conseguiu cultivar determinados fungos fitopatógenos denominados de

carvões (ordem Ustilaginales), ferrugens (ordem Uredinales) ou míldios ordens Peronosporales e Erysiphales) (Bastos, 2019).

A nutrição de C/N exerce efeito nos processos fisiológicos de fungos, e permite também estabelecer diferenças entre isolados de *Sclerotium rolfii*, visando estabelecer a variabilidade da espécie com base em alguns processos fisiológicos (Couto; Menezes, 2004).

3.4 Tipos de meios de cultura e metodologia de preparo

É necessário se estabelecer condições de cultivo que permitam o bom desenvolvimento destes microrganismos. Dentre estas condições, a esterilização merece considerável atenção (Santos et al., 2005). A temperatura influencia tanto o crescimento micelial, a esporulação, a germinação das colônias, podendo ser utilizada como parâmetro para diferenciação do crescimento (Silva; Teixeira, 2012).

No entanto, é importante ressaltar que, embora a utilização de meios naturais no processo de alternativo apresente diversas vantagens, ainda existem limitações para o incremento de sua utilização, visto que, a eficiência dos extratos na inserção no laboratório depende, muitas vezes, do período de coleta, das condições de armazenamento, do tipo de patógeno e dos processos tecnológicos utilizados na obtenção e manipulação (Cordeiro, 2015).

a) Meio peptona-dextrose-ágar (PDA) é utilizado para isolamento de *Cylindrocladium* spp. A partir de amostras de solo. Seu preparo, afunda o ágar em 500 mL de água, dissolva os demais componentes, ajuste o volume para 1.000 mL com água destilada e autoclave. Após a autoclavagem. Ajuste o pH para 4,0 com ácido láctico 25% (Alfenas; Mafía, 2007).

b) Meio PCDB-ágar é usado no isolamento de *Fusarium* spp. A partir de amostras do solo. Para seu preparo, de água destilada afunda o ágar em 500 mL, dissolva os demais componentes, ajuste o volume do meio para 1.000 mL de água destilada e proceda com a autoclavagem. Após o resfriamento do meio a 45-50°C, adicione cloro tetraciclina e sulfato de estreptomicina (Alfenas; Mafía, 2007).

c) Meio SV-8M utilizado para isolamento de *Phytophthora*. Para seu preparo, afunda o ágar em 500 mL de água destilada, adicione o suco V-8 complete o volume para 1.000 mL, e após a autoclavagem e estudando em meio a 45-50°C, adicione pimaricina, vancomicina, ampicilina e quintozane (Alfenas; Mafía, 2007).

d) Meio Kerr-ágar (MKA) meio seletivo para isolamento de *Phytophthora cinamomi* e *Pythium* spp. Para seu preparo, afunda o ágar em 500 mL de água destilada, adicione os mais componentes, ajuste o volume para 1.000 mL e, após autoclavagem, adicione sulfato de

estreptomicina, PCNB e micostatin, em meio fundante (50°). Ajuste para o pH para 4,8 com ácido láctico (Alfenas; Mafia, 2007).

e) Meio com meal-ágar é usado no isolamento de omicetos a partir de amostras de solo ou raízes infectadas. Para seu preparo, afunda os componentes, ajuste o volume para 1.000 mL de água destilada e, após autoclavagem e quitozane não pode conter hymexazolol, o qual inibe o seu crescimento (Alfenas; Mafia, 2007).

f) Meio Vartaza empregado no isolamento de *Pythium sp.* Para seu preparo, afunda o ágar em água destilada, adicione os demais componentes, complete o volume para 1.000 mL com água destilada e autoclave. Meio K0 e Hora é usado para quantificar e isolar *Rhizoctomia solari* em amostras de solo. Parra seu preparo, afunda o ágar em 500 mL de água destilada, adicione os demais componentes, complete o volume para 1.000 mL com água destilada e autoclave. Após a autoclavagem, assim que o meio atingir 45-50°C, adicione fenaminossulfato cloranfenicol e estreptomicina (Alfenas; Mafia, 2007).

g) Meio Conradie é usado no isolamento de *Chryphomectria cubensis* (= *Chryphomectria cubensis*) a partir das plantas senescentes e amostras de solo. Adicione os componentes do meio, complete o volume para 1.0000 mL com água destilada e após autoclavagem, adicione ao meio fundente (45-50°C) clorotalonil, dicloram, vincozolan e sulfato de estreptomicina (Alfenas; Mafia, 2007).

A elaboração dos meios de cultura possui as seguintes etapas:

a) A cada substância química deve ser dissolvida completamente, em um volume apropriado de água destilada, antes de ser adicionada outra substância.

b) Determinar o pH, ajustando-o, se for necessário, para o pH desejado, acrescentando solução básica ou ácida. Geralmente, os meios de cultura para fungos não necessitam de ajuste de pH uma vez que estes toleram uma ampla faixa de pH (2 a 9). No entanto, um ajuste para um pH entre 4 e 7 é mais adequado.

c) O meio é distribuído em frascos adequados (erlenmeyer, balão ou tubo de ensaio) cujas bocas devem ser fechadas com tampão de algodão hidrófobo. Não encher completamente o frasco, isto é, para um frasco com capacidade de 500 ml, colocar no máximo 300 ml de meio (aproximadamente 2/3 da capacidade do frasco). Acrescentar quando desejar meio sólido. o meio de cultura é esterilizado em autoclave, na maioria das vezes, e redistribuído à temperatura de cerca de 45°C para placas de Petri em ambiente asséptico (Câmara de fluxo laminar ou câmara asséptica de luz UV) (Bastos, 2019).

O meio BDA e luz branca, ainda utilizado por diversos autores para crescimento e esporulação destas duas espécies, mostrou resultados razoáveis e pode ser empregado, desde

que os isolados utilizados esporulem nestas condições e que grandes quantidades de esporos não sejam requeridas. Entretanto, quando se usam isolados problemáticos em relação à esporulação, ou quando grandes quantidades de esporos são necessárias, sugere-se utilizar o método aqui desenvolvido, para maiores chances de sucesso. (Pulz; Massola Jr, 2008).

3.5 *Sclerotium rolfii* e o Solo

Os fungos pertencem ao Reino Fungi, e são caracterizados como seres eucarióticos e heterotróficos, com parede celular constituída por quitina e glucanos, e apresentam como reserva de energia o glicogênio. Podem ser unicelulares, denominados de leveduras, ou multicelulares, estes conhecidos como fungos filamentosos uma vez que são formados por filamentos, cuja unidade é chamada de hifas e o conjunto de hifas denomina-se de micélio (Carneiro, 2023).

Eles se alimentam absorvendo nutrientes por meio de suas hifas. Assim, para poder atravessar a parede celular e utilizar os componentes como nutrientes, os substratos de alto peso molecular necessita ser hidrolisados a moléculas menores. Para isto, os fungos liberam enzimas extracelulares que, quanto mais diversas e numerosas, proporcionarão maiores vantagens para viverem em ambientes com diferentes condições. (Meyer; Mazaro; Silva, 2019).

Um fator importante na produção de massa de um fungo é a seleção de um meio padrão para seu cultivo e a determinação das condições adequadas que permitam bom crescimento com alta esporulação. A seleção de um meio padrão pressupõe o conhecimento das condições nutricionais ideais para o cultivo do fungo (Barbosa et al. 2002). Avaliaram diferentes meios de cultura, fontes de C, de N e relações C:N no desenvolvimento dos isolados analisou diversas fontes de P e a influência de relações C:P e C:N:P no crescimento e esporulação dos mesmos isolados (Souza et al., 2015).

Sclerotium rolfii Sacc. é uma das mais relevantes, sendo o fungo um importante fitopatógeno habitante de solo, sendo responsável por podridão de raízes e do colo, murcha e tombamento de plântulas. Apresenta extensa gama de hospedeiros, cerca de 500 espécies botânicas, incluindo dicotiledôneas e monocotiledôneas, distribuindo-se em todas as regiões agrícolas, com predominância nas zonas tropical e subtropical, onde predominam condições de alta umidade e temperatura elevada (Serra; Silva, 2005). Esse patógeno, mundialmente distribuído, possui vasta gama de hospedeiros, incluindo espécies hortícolas, ornamentais, leguminosas, cereais forrageiras e daninhas em 500 espécies botânicas. (Isaias et al., 2014).

É um importante fitopatógeno habitante do solo, sendo responsável por causar sintomas de podridão de raízes, do colo, de bulbos e frutos, causando murcha, tombamento de plântulas

e podridões. Apresenta extensa gama de hospedeiros, cerca de 200 espécies de plantas, pertencentes a quase 100 famílias botânicas, incluindo dicotiledôneas e monocotiledôneas, distribuindo-se em todas as regiões agrícolas do país com predominância nos estados de MG, PE, SP, DF, BA, SC, TO, ES, PB, RS (Marcuzzo; Schuller, 2014).

O controle de fitopatógenos habitantes do solo é difícil, devido à grande capacidade de sobrevivência. A sobrevivência de *Sclerotium rolfsii*, em solo, é prolongada, podendo chegar a até oito anos. A incorporação de material vegetal ao solo possibilita a melhoria da fertilidade, fornece nutrientes aos microrganismos controladores biológicos, pode proporcionar a liberação de substâncias tóxicas aos patógenos durante a decomposição da biomassa, e induzir resistência na planta hospedeira

Os fitopatógenos podem ocasionar reduções indiretas na produtividade, devido à ação debilitante que exercem sobre a planta hospedeira, como também podem reduzir drasticamente a produtividade, ou mesmo a qualidade na pré e pós-colheita, interferindo significativamente na rentabilidade e na sustentabilidade da produção (Moreira, 2017). Durante a fase de colheita e pós-colheita é importante a tomada de cuidados a fim de evitar fermentos, os quais facilitam a penetração de fitopatógenos (Lundgren, 2021). O efeito tóxico e o crescimento de fungos fitopatogênicos também tem sido demonstrado em outros trabalhos (Santos, 2017).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos Geral

Determinar o potencial de crescimento e formação de estrutura de resistência de *Sclerotium Rolfsii* em meios de cultura alternativos com adição se caldo de cana-de-açúcar.

4.2 Objetivos Específicos

- Aferir o diâmetro e a dinâmica de crescimento de *Sclerotium rolfsii* nos meios de cultura alternativos;
- Identificar o desenvolvimento de estrutura de resistência de *Sclerotium rolfsii* nos meios de cultura alternativos durante sete dias;
- Identificar através do efeito comparativo entre os meios de cultura, qual proporciona melhor desenvolvimento do *Sclerotium rolfsii*.

5 METODOLOGIA

5.1 Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências de Chapadinha da Universidade Federal do Maranhão, Campus de Chapadinha. Com a presença de meios de culturas sólidos que foram preparados com diferentes ingredientes e utilizados para avaliar o crescimento e esporulação do *Sclerotium rolfsii*.

5.2 Meios de cultura

Os meios de cultura naturais utilizados no experimento, foram preparados com fruta, tubérculos e/ou raízes tuberosas. A escolha desses ingredientes foi levada em consideração sua riqueza nutritiva e principalmente sua fácil obtenção. Foram preparados de forma convencional o meio de abóbora, de banana, de cenoura, de beterraba, de batata inglesa, de batata-doce e de macaxeira. Em todos os meios de cultura foi acrescido como fonte de adoçante natural, o caldo de cana-de-açúcar e o ágar para adquirir consistência sólida. Os ingredientes dos meios de cultura foram obtidos em mercado comercial local da cidade de Chapadinha.

5.3 Preparo dos meios de cultura

Os meios de cultura foram preparados conforme metodologias empregadas para a maioria das constituições de preparo que compreende em medir e pesar os ingredientes, utilizar o caldo do cozimento de fruta, raízes e tubérculos, juntar os ingredientes, adicionar o ágar diluído e submeter ao processo de esterilização em autoclave à 121° C e 1 atm de pressão. Após a esterilização, os meios assim que alcançarem temperatura morna, foram vertidos em placas de Petri de 9 cm de diâmetro formando discos de cultivo sólidos de 3 mm de espessura. Estes foram utilizados para o cultivo de *S. rolfsii* visando avaliação de seu desenvolvimento e formação de escleródios.

5.4 Obtenção do isolado e cultivo do *Sclerotium rolfsii*

O isolado de *S. rolfsii* utilizado para o cultivo nos diferentes meios de cultura avaliados foi obtido em fazenda de cultivo de soja da microrregião de Chapadinha. Para isso, plantas de soja apresentando o morfo branco foi levado ao Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia do Centro de Ciências de Chapadinha e submetido ao processo de isolamento e cultivo em meio

básico de B.D.A (Batata-Dextrose-Ágar). O isolado puro de *S. rolfsii* foi repicado e cultivado em meio limpo durante todo o período experimental da pesquisa.

5.5 Avaliação realizadas

O desenvolvimento das colônias nos diferentes meios de cultura foi avaliado medindo as seguintes variáveis: diâmetro de crescimento a cada 24 horas até que a primeira colônia se alcançar o diâmetro total da placa de Petri e a formação das estruturas de resistência (os escleródios) em cada colônia no final da avaliação, ao qual correspondeu ao crescimento máximo na placa de Petri em que a primeira colônia alcançou, que foi de sete dias.

O diâmetro de crescimento foi medido com auxílio de um paquímetro digital a cada 24 horas. A presença de estruturas de resistência foi avaliada com a observação individual de cada colônia desenvolvida nos diferentes meios de cultura. Nesta foi aferido a presença e/ou ausência dessas estruturas e, na existência delas, contabilizar a quantidade presente.

5.6 Delineamento experimental

O delineamento experimental que foi utilizado constou de 08 tratamentos e 08 repetições, totalizando 49 unidades experimentais.

5.7 Variáveis analisadas

Durante 7 dias de avaliação de experimento, foi realizada a cada 24h a medição com auxílio de um paquímetro digital, o diâmetro de crescimento das colônias, individualmente nas 56 placas contendo os meios de culturas naturais (meio de abóbora, beterraba, batata inglesa, batata-doce, cenoura, macaxeira e banana) com adição de caldo de cana-de-açúcar. Essa variável permite avaliar a o meio que promove melhor desenvolvimento do *S. rolfsii*.

5.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise estatística de Variância - ANOVA a 5% de probabilidade de erro. E a médias comparadas pelo teste Duncan ao nível de 5% de significância por meio de planilhas preparadas no Programa Microsoft Excel 17.0.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise estatística dos dados, não houve diferença no desenvolvimento da colônia de *S. rolfsii* entre os meios de cultura naturais quando comparados com a o meio de cultivo testemunha (BDA sintético), indicando que todos os meios proporcionaram um bom desenvolvimento no diâmetro de crescimento (Tabela 1). Entretanto mesmo não havendo diferença estatística entre os tratamentos e a testemunha, observa-se que a adição do caldo de cana-de-açúcar favoreceu desenvolvimento superior em todos os meios naturais avaliados quando comparados à testemunha que é considerado um meio clássico para o cultivo de fungos fitopatogênicos.

Observa-se também que quando observado o diâmetro de crescimento ao longo dos dias avaliados, é notório e satisfatório o crescimento ativo do *S. rolfsii* principalmente a partir do segundo dia da avaliação e com um aumento considerável nos três últimos dias (5º, 6º e 7º dia) da avaliação.

TABELA 1. Médias do diâmetro de crescimento de colônias de *Sclerotium rolfsii* a cada 24 horas durante sete dias de avaliação em diferentes meios de culturas naturais com adição de caldo de cana-de-açúcar.

Tratamentos	Médias do diâmetro de crescimento por dia						
	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia
BDR	1,09 ^a	4,42 ^a	9,11 ^a	16,69 ^a	23,70 ^a	26,89 ^a	31,36 ^a
Bat. Inglesa	1,47 ^a	6,59 ^a	14,65 ^{ac}	24,05 ^a	36,04 ^{aA}	39,60 ^{aC}	39,91 ^{aB}
Macaxeira	2,00 ^{ab}	6,41 ^{ac}	14,25 ^a	22,35 ^{ab}	33,78 ^a	39,19 ^{ab}	40,24 ^{ad}
Abóbora	1,70 ^a	6,56 ^{ab}	14,90 ^{ab}	24,33 ^a	35,98 ^{ab}	40,73 ^a	41,29 ^{aC}
Bat. Doce	1,07 ^{aA}	6,07 ^a	12,55 ^a	22,43 ^a	28,85 ^a	35,29 ^{ac}	35,32 ^{aC}
Beterraba	1,42 ^a	4,37 ^a	10,18 ^a	16,26 ^a	25,38 ^a	29,08 ^{aA}	29,94 ^a
Banana	1,59 ^a	6,66 ^{aA}	14,05 ^a	21,78 ^a	34,42 ^a	39,36 ^{aB}	39,57 ^{ab}
Cenoura	1,74 ^{ac}	6,32 ^a	12,35 ^a	22,41 ^{ac}	34,81 ^{ac}	39,97 ^{ad}	40,08 ^{Aa}
Valores de P	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P>0,05

Fonte: De autoria própria, (2023).

Médias seguida de mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Apesar de não ter havido diferença estatística entre os tratamentos quando comparado à testemunha, esta foi a que apresentou pelo menos os menores diâmetros de crescimento quando comparadas aos demais meios de cultura avaliados na maioria dos dias avaliados.

A análise estatística também revela que houve diferenças estatísticas quando comparados os tratamentos entre si, observados quando avaliamos os tratamentos durante os setes dias avaliados. No primeiro dia, houve diferença estatística entre o meio de macaxeira, de batata doce e o de cenoura entre si, mas estes não diferiram do meio testemunha (BDA sintético). O meio de batata doce apresentou o menor diâmetro de crescimento inicial quando comparado aos demais e a testemunha.

No segundo dia, o meio de macaxeira, abóbora e banana diferiram entre si, entretanto não diferiram dos demais tratamentos e da testemunha. O meio de banana foi o que apresentou maior diâmetro de crescimento e o meio beterraba, o menor, até mesmo comparado ao meio testemunha (Tabela 1).

No terceiro dia, o meio de batata inglesa e abóbora diferiram entre si, mas não dos demais tratamento e da testemunha. Observa-se que estes dois meios se destacaram entre os demais, apresentando os maiores diâmetros de crescimento das colônias. No quarto dia, os meios de macaxeira, e cenoura diferiram entre si, entretanto não diferiram dos demais tratamentos e da testemunha. O meio de abóbora apresentou maior diâmetro de crescimento, já os meios de beterraba e meio de BDA sintético (testemunha), os menores valores, respectivamente (Tabela 1). No quinto dia, os meios de batata inglesa, abóbora e cenoura diferiram entre si, mas não dos demais tratamentos e da testemunha. O meio de batata inglesa apresentou o menor diâmetro de crescimento e a testemunha, o menor (Tabela 1).

No sexto dia, a maioria dos tratamentos diferiram entre si, mas não da testemunha e do meio de abóbora, que apresentou o maior diâmetro de crescimento. O meio testemunha apresentou o menor diâmetro de crescimento (Tabela 1).

No sétimo dia, os meios de batata inglesa, macaxeira, banana e cenoura diferiram entre si e dos meios de abóbora e batata doce. Estes dois últimos não diferiram entre si. Mas, nenhum meio diferiu da testemunha (Tabela 1).

Durante os setes dia de avaliação, o meio testemunha estava sempre entre os que apresentaram os menores valores de diâmetro de crescimento. E observa-se também que o meio de BDA sintético apresentou os menores valores de diâmetro de crescimento, principalmente

no terceiro, quinto e sexto dia de avaliação (Tabela 1). Isso sugere que os meios de cultura naturais com adição de caldo de cana-de-açúcar favoreceram o desenvolvimento satisfatório ao *S. rolfsii*.

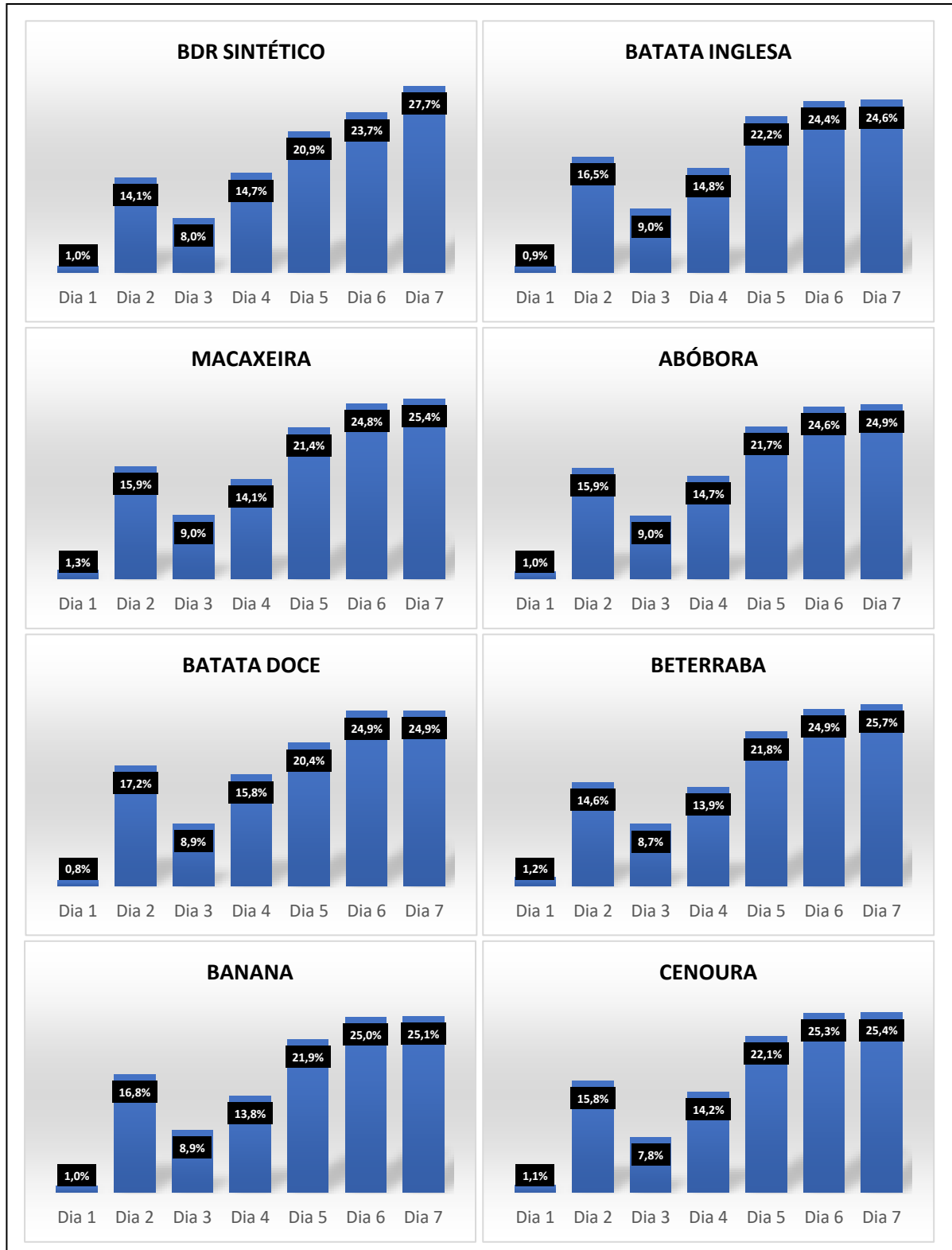
O incremento de caldo de cana-de-açúcar como fonte de sacarose, e como fonte alternativa aos aditivos sintéticos, que geralmente apresentam valores elevados para aquisição, proporcionou desenvolvimentos das colônias nos diferentes meios avaliados, pois os dados da análise estatística revelam que estes são tão bons, quanto o meio clássico e tradicional (BDA sintético) para o desenvolvimento das colônias de fungos fitopatogênicos como o *S. rolfsii*. O meio que se destacou por apresentar maiores valores de diâmetros de crescimento das colônias na maioria dos dias avaliados foi o de abóbora. A abóbora e o caldo de cana-de-açúcar por ser produtos que podem ser encontrados frequentemente podem ser utilizados para nas rotinas de laboratório para o cultivo de fungos fitopatogênicos. E trabalhos futuros merecem ser realizados sobretudo para analisar o desenvolvimento de diferentes fungos e bactérias fitopatogênicas cultivados com este meio.

Durante os setes dias de avaliação do crescimento das colônias de *S. rolfsii* não ocorreu desenvolvimento de estrutura de resistência em nenhum dos meios de culturas avaliados. Isto se deve provavelmente ao período de cultivo de sete dias ser curto para a desenvolvimento dessas estruturas. De acordo com De Souza (2023), para a formação dos escleródios, ele utilizou um período de 30 dias para a formação completa dessas estruturas.

Observa-se que todos os meios de cultura tiveram um percentual de crescimento inicial baixo, aumentando consideravelmente ao longo dos dias de avaliação e principalmente nos últimos três dias que atingiu o dobro de percentual de crescimento (Figura 1). De 24 a 48 horas, houve um crescimento intenso, e diminuiu consideravelmente no intervalo seguinte entre 48 e 72 horas, onde o percentual de crescimento o menor entre os dias de avaliação. E observa-se que o percentual de crescimento das colônias foi semelhante em todos os dias de avaliação quando observados os meios de cultura em cada dia isoladamente (Figura 1).

De acordo com Souza (2023), os fungos produzem um crescimento muito rápido em meio de cultura, principalmente quando os meios utilizados apresentam bons aspectos nutricionais e sob temperatura adequada.

Figura 1. Porcentual do desenvolvimento das colônias de *S. rolf sii* em placas de Petri contendo discos de cultivo de meios naturais (batata inglesa, macaxeira, abóbora, batata doce, beterraba, banana e cenoura) com adição de caldo de cana-de-açúcar e o BDA sintético (testemunha) ao longo dos sete dias de avaliação.



Fonte: De autoria própria, (2023).

7 CONCLUSÃO

Os meios de cultura naturais (batata inglesa, macaxeira, abóbora, batata doce, beterraba, banana e cenoura) com adição de caldo de cana-de-açúcar apresentam condições nutricionais satisfatório para o desenvolvimento de *S. rolfsii* pois favoreceram um diâmetro de crescimento equivalentes ao meio clássico de BDA sintético para cultivo de fungo fitopatogênico. Não houve desenvolvimento de estrutura de resistência durante o período de desenvolvimento analisado.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. 1. ed. Universidade Federal de Viçosa. UFV. 2007.
- AMBRÓSIO, M. M. Q.; BUENO, C. J.; PODOVANI, C. R.; SOUZA, N. L. **Sobrevivência de Fungos Fitopatogênicos habitantes do solo, em microcosmo, simulando solarização com prévia incorporação de materiais orgânicos**. *Summa Phytopathol*, Botucatu, v. 35, n. 1, p. 20-25, 2009.
- ALBURQUERQUE LABORDA, L. P.; LOBATO, A.C.N.; SILVA FILHO, D.F.; COELHO NETTO, R.A. **Incorporação de biomassa de fabáceas ao substrato de plantio para controle da podridão-de-escleródio (*Sclerotium rolfsii*) em cubiu (*Solanum sessiliflorum*)**. *Summa Phytopathologica*. V.45, n.4, p.399-405, 2019.
- BASTOS, T. G. SIDNEY, **Meios de Cultura de Fungos**. 2019. Disponível em: Meios De /Cultura Para Fungos [pon2o5133jl0] (idoc.pub) - Pesquisar (bing.com), Acesso em: 11/09/2023.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Módulo 3: Principais Síndromes Infeciosas. Brasília: Anvisa, 2013.
- COUTO, E. F.; MENEZES, M. **Caracterização de fisiomorfológica de isolados de *Colletotrichum musae***. *Fitopatol. bras.* 29(4), jul-ago, 2004.
- CARMINATE, BRUNA. **Atividade de extratos etanólicos sobre o controle "in vitro" de *Colletotrichum musae***. 2015. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) - Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, 2015.
- CARNEIRO, RAIANA DE OLIVEIRA. **Fungos como Agentes de Controle Biológico de Pragas Agrícolas: Uma Revisão de Bibliográfica**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Agrônoma), Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2023.
- CORDEIRO, MARIA LÚCIA DA SILVA. **Atividade fungitóxica de extratos vegetais de plantas nativas do bioma caatinga sobre o fungo *Colletotrichum musae*, agente causal da**

antracnose em banana. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos), Universidade Federal de Campina Grande, Sumé, 2015.

DE SOUZA, J. J. F. Produtos alternativos no controle in vitro e na sobrevivência de escleródios de *Sclerotium rolfsii* do tomateiro/ José Jânderson Ferreira de Souza. **Tese de Doutorado.** – 2023, 34p.: il.

FARIA, C. M. X; INÁCIO, C. A. **Considerações sobre o gênero *Coletrichum*.** Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP). v. 29, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2023.

FREITAS, S. M., **Criação de um atlas de microbiologia com enfoque na morfologia de colônias em diferentes meios de cultura das principais espécies bacterianas de importância clínica, veterinária e ambiental.** 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas), Universidade Federal de São Paulo, Diadema, 2022.

ISAIAS, C. O.; MARTINS, I.; SILVA, J. B. T.; SILVA, J. P; MELLO, S. C. M. **Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma spp.* contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*.** Summa Phytopathologica, v.40, n.1, p.34-41, 2014.

LUNDGREN, GIOVANNA ALENCAR. **Desenvolvimento e aplicação de revestimento com goma arábica e óleo Essencial de *Conyza bonariensis* (L) Cronquist para controle de antracnose em banana.** 2021. Tese (Doutorado em Ciências da Nutrição), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2021.

MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. ***Trichoderma*: Uso na Agricultura.** EMBRPA, Distrito Federal, Brasília, 2019.

MARCUZZO, L. L.; SCHULLER, A. **Sobrevivência e viabilidade de escleródios de *Sclerotium rolfsii* no solo.** Summa Phytopathol, Botucatu, v. 40, n. 3, p. 281-283, 2014.

MOREIRA, CARLA DE NAZARETH BUAES. **Efeito de Extrato Aquoso do Nim (*Azadirachta indica*) Sobre o *Fusarium Solani* em Mudas de Mamoeiro.** 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia), Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha, Maranhão, 2017.

NASCIMENTO, S. R. C.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; SILVA, F. H. A.; GUIMARÃES, L. M. S. **Meios de Cultura Semis-seletivos para Maacrophomina Phaseolina**. Summa Phytopathol. v. 40, p. 334-337, Botucatu, 2014.

ONO, L.; LOPES, J. M. K.; FOLLADOR, S. M.; MARQUES, F. J.; DIA, D. A. T. **Confecção e avaliação de incubadora e meios de cultura de baixos custos com materiais didáticos para práticas no ensino médio**. Educação, Ciência e Saúde, V 7, N 2, p. 114-133, jul-dez, 2020.

PULZ, P; MASSOL JR., N. S. **Efeito de meios de cultura e fatores físicos no crescimento e esporulação de alternaria *Dauci* e *A. solani***. Summa Phytopathol. Piracicaba, V 35, N° 2, p 121-126, 2008.

POLTRONIERI, T. P. S.; AZEVEDO, L. A. S.; SILVA, D. E. M. **Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolados de frutos de palmeira juçara (*Euterpe edulis Mart*)**. Summa Phytopathol., Botucatu, v. 39, n. 4, p. 281-285, 2013.

SOUZA, FERNANDA CORRÊA. **Crescimento e esporulação de isolados de *Stemphylium* sp. Sob diferentes meios de cultura e condições de ambiente**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Fitotecnia), Seropédica, Rio de Janeiro, 2015.

SANTOS, J.; REY, M. S.; ROSSETO, E. A.; PIEROBOM, C. R. **Crescimento e esporulação de três raças de *Colletrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn) sob quatro condições de luminosidade**. R. bras. Agrociência, Pelotas, v. 11, n. 4, p. 493-495, out-dez, 2005.

SANTOS, MAURÍCIO FRANCO DOS. **Efeitos dos extratos vegetais sobre *Colletrichum spp.* Agente causal da antracnose pós-colheita em pimenta de cheiro (*Capsicum chinense jacq.*)**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia), Universidade Federal do Amazonas, Humaitá, 2017.

SILVA, FRANCIMARA CARDOSO DA. **Efeito de extratos vegetais no controle de *Meloidogyne Incognita* (Kofoid; White) Chitwood “*In vitro*”**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia), Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha, 2019.

SERRA, I. M. R. S.; SILVA, G. S. **Caracterização biológica e fisiológica de *Sclerotium rolfsii* obtidos de pimentão no Estado do Maranhão.** Fitopatol. bras. 30(1), jan-fev, 2005.

SOUZA, J. F. JOSÉ. **Produtos Alternativos no Controle *in vitro* e na Sobrevivência de Escleródios de *Sclerotium rolfsii* do Tomateiro.** 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia), Universidade Federal Rural do Sêmi-Árido, Mossoró, 2023.

SILVA, J. L.; TEIXEIRA, R. N. V, **Esporulação e Crescimento Micelial de *Fusarium Solani* em Diferentes Meios de Cultura e Regimes de Luminosidade.** Revista Agro@mbiente Online, v. 6, n. 1, p. 47-52, jan-abr, 2012.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul. **Meios de Cultura para Bactérias.** Disponível em: https://www.ufrgs.br/aulaspraticasdempip/?page_id=78. Acesso em: 11/09/2023.

VIEIRA, D. A. P.; FERNANDES, N. C. A. Q. **Microbiologia Aplicada.** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia. Inhumas, Goiás, 2012.