

NOTAS CIENTÍFICAS

REQUISITOS NUTRICIONAIS PARA O FUNGO *ALTERNARIA ALTERNATA*¹

CELIA MARIA MAGANHOTTO DE S. SILVA² e ITAMAR SOARES DE MELO³

RESUMO - Uma linhagem de *Alternaria alternata* (ALT A) foi cultivada em meio sintético com diferentes fontes de C, N e vitaminas. O crescimento micelial foi avaliado durante sete dias após a semeadura e a esporulação no décimo dia de incubação. O meio sintético básico suplementado com biotina, NH₄Cl e os carboidratos maltose e glicose suportaram um bom crescimento micelial (em média 0,75 cm/dia). Galactose e arabinose induziram significativamente a produção de esporos (mL⁻¹), da ordem de 5,0 x 10³ e 4,1 x 10³, respectivamente. Nas diferentes fontes de vitamina e N não houve diferenças significativas quanto ao crescimento micelial e à esporulação.

NUTRITIONAL REQUIREMENTS FOR THE FUNGUS *ALTERNARIA ALTERNATA*

ABSTRACT - A strain of *Alternaria alternata* (ALT A) was tested using different sources of C, N and vitamins in order to find a medium for its growth and sporulation. The mycelial growth was evaluated for seven days after sowing and the sporulation on the tenth day of incubation. Among various C, N and vitamins compounds tested, highest mycelial growth was achieved with maltose and glucose (C), NH₄Cl (N) and biotin, with an average ratio of 0.75 cm/day. Sporulation reached highest values with galactose and arabinose (5.0 x 10³ and 4.1 x 10³ conidia mL⁻¹, respectively). Others vitamins and N compounds did not influence the growth and sporulation.

O equilíbrio de fontes de C, N, P, vitaminas e micronutrientes na composição do meio de cultura, são fatores decisivos para o crescimento e esporulação dos microrganismos, notadamente o tipo e a concentração de fontes de C e N. Muitos microrganismos, pouco exigentes, como as *Pseudomonas*, podem crescer em meios de cultura com composição sintética simples, porém numerosos microrganismos necessitam de um ou mais micronutrientes, vitaminas ou outros compostos. É desejável encontrar para cada microrganismo as necessidades mínimas de nutrição e, com isso, desenvolver um meio mínimo que contenha somente os compostos realmente necessários ao crescimento e à esporulação.

¹ Aceito para publicação em 5 de junho de 1998.

² Bióloga, Ph.D., Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação do Impacto Ambiental (CNPMA), Rodovia SP-340, Km 127,5, Caixa Postal 69, CEP 13820-000 Jaguariúna, SP. E-mail: celia@cnpma.embrapa.br

³ Eng. Agr., Ph.D., Embrapa-CNPMA.

O fungo *Alternaria* sp. tem sido encontrado como organismos saprófitas ou parasitas de plantas. É descrito como tendo um crescimento lento e baixa esporulação em meios de cultura convencionais. A linhagem ALT A de *A. alternata*, isolada por Silva (1996) como degradadora do fungicida carbendazim também apresenta lento crescimento e esporulação reduzida, o que tem dificultado a produção do inóculo em grande escala. Desse modo sua produção, formulação e utilização para fins de biorremediação em solos agrícolas contaminados sofrem restrições.

Alguns trabalhos reportam sobre diferentes métodos de indução à esporulação (Misaghi et al., 1978; Ungaro & Azevedo, 1986; Kostecki et al., 1991; Silva, 1996), no entanto, ainda são necessários estudos que determinem um meio de cultura com as necessidades mínimas de nutrição. Assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver um meio de cultura ideal para a otimização do crescimento e esporulação da espécie *A. alternata*, testando-se diferentes fontes de C, N e vitaminas.

Foi utilizada uma linhagem de *A. alternata* (ALT A), isolada de solos agrícolas e considerada como um potente degradador do fungicida carbendazim (Silva, 1996). Para encontrar um meio sintético adequado ao crescimento e à esporulação desse fungo, discos de ágar (0,7 cm de diâmetro) contendo micélio foram cultivados em meio de cultura acrescido de diferentes fontes de C, N e vitaminas. Várias fontes de C (arabinose: 60 mM, galactose: 60 mM, frutose: 60 mM, xilose: 60 mM, inositol: 60 mM, manitol: 60 mM, celobiose: 60 mM, glicose: 60 mM, sacarose: 30 mM, sorbitol: 30 mM e maltose: 30 mM) e N (KNO₃: 19 mM, glutamina: 13 mM e NH₄Cl: 37 mM) foram testadas separadamente no meio sintético, cuja composição foi a seguinte: NaCl: 0,5 g; K₂SO₄: 0,35 g; Mg-glicerofosfato: 0,25 g; Ca-glicerofosfato: 0,25 g; elementos traços: 5 mL; pH: 5,0; água destilada: 1000 mL. Os elementos traços acrescidos ao meio de cultura foram: FeCl₃: 10 mg; MgCl₂.4H₂O: 10 mg; ZnSO₄.7H₂O: 5 mg; CuSO₄.5H₂O: 1 mg; MoO₃: 0,5 mg; H₃BO₃: 0,25 mg. Para determinar a necessidade de vitaminas como requisito para o crescimento e a esporulação, o meio sintético foi suplementado com piridoxina, biotina e tiamina, separadamente. As fontes de C e N fixadas foram glicose e NH₄Cl, respectivamente.

Foram avaliados o crescimento radial das colônias e a esporulação efetuada no décimo dia de incubação, cuja condição de cultivo foi escuro a 28°C. A suspensão de conídios foi formada pela adição de cinco discos de meio de cultura (0,7 cm de diâmetro), em 10 mL de uma solução de "tween 80" 0,1%. O número de conídios foi quantificado com auxílio da câmara de Neubauer. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com cinco repetições.

O efeito das diferentes fontes de C sobre o crescimento e a esporulação de *A. alternata* pode ser observado na Tabela 1. O meio sintético suplementado com biotina, NH₄Cl e os carboidratos maltose e glicose suportaram bom crescimento micelial do fungo (em média 0,75 cm/dia). Outros substratos como galactose e arabinose produziram pequenas quantidades de micélio, enquanto as fontes de C restantes apresentaram taxas de crescimento semelhantes, indicando que não houve efeito significativo na utilização dos substratos

pela linhagem de *A. alternata* em estudo. A produção de conídios apresentou comportamento diferenciado dependendo do substrato. Na presença de galactose ($5,0 \times 10^3$ conídios mL^{-1}) e arabinose ($4,1 \times 10^3$ conídios mL^{-1}) observou-se maior número de conídios, enquanto na presença de sacarose não foi verificado seu desenvolvimento.

A suplementação do meio sintético com vitaminas + glicose + NH_4Cl (Tabela 2) resultou em crescimento micelial semelhante com as vitaminas biotina e piridoxina. Com tiamina o crescimento foi reduzido, diferindo das demais; a esporulação, ao contrário foi favorecida pela adição de tiamina, que permitiu a produção de conídios ($1,3 \times 10^3$ conídios mL^{-1}). Não houve evidências do efeito das demais vitaminas na esporulação.

No meio de cultura sintético suplementado com glicose e biotina, a adição de nitrato de potássio suportou um bom crescimento micelial (0,72 cm/dia),

TABELA 1. Avaliação do crescimento micelial e esporulação de *Alternaria alternata* em meio sintético básico com diferentes fontes de carbono (média de cinco repetições).

Fonte de carbono	Taxa de crescimento micelial		Esporulação ($\times 10^3$ conídios/mL)
	cm/dia ¹	Ø colônia ²	
D-arabinose	0,46a	5,1	4,1
D-galactose	0,60b	6,6	5,0
D-frutose	0,71c	7,8	3,0
Xilose	0,71c	7,9	1,6
Inositol	0,73c	8,0	1,9
Manitol	0,73c	8,0	1,6
Celobiose	0,73c	8,0	0,3
D-glicose	0,74c	8,1	2,5
Sacarose	0,75c	8,3	0,0
Sorbitol	0,76c	8,4	0,6
D-maltose	0,77c	8,4	0,6

¹ Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade (CV=4,53%).

² Médias (cm) tomadas aos sete dias de incubação.

TABELA 2. Avaliação do crescimento micelial e esporulação de *Alternaria alternata* em meio sintético básico suplementado com diferentes vitaminas (média de cinco repetições).

Fonte de vitamina	Taxa de crescimento micelial		Esporulação ($\times 10^3$ conídios/mL)
	cm/dia ¹	Ø colônia ²	
Biotina	0,72a	6,3	0,5
Piridoxina	0,70a	6,3	0,5
Tiamina	0,55b	5,9	1,3

¹ Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade (DMS = 0,134 e CV = 12,09%).

² Médias (cm) tomadas aos sete dias de crescimento.

enquanto a adição de cloreto de amônia e glutamina mostrou-se estatisticamente inferior com relação ao crescimento vegetativo (Tabela 3). Comparando as diferentes fontes de N, não observaram-se diferenças na produção de conídios entre KNO_3 e NH_4Cl . Em presença de glutamina a formação de conídios foi inibida.

Tais resultados levam a concluir que as fontes de C e N foram os fatores que mais influenciaram o crescimento, sendo aquela essencial à produção de conídios. Na produção de inóculo, tanto para uso em plantas como para fins de biorremediação, quaisquer formas de propágulos, micélio ou esporos, podem ser efetivas. Urge determinar qual delas é a mais rápida, mais efetiva e, conseqüentemente, mais econômica.

Somente poucos mono e dissacarídeos, em combinação com KNO_3 como fonte de N foram utilizados por *A. alternata*. A adição de vitaminas foi essencial para o desenvolvimento dessa linhagem fúngica. As vitaminas são dispensáveis no desenvolvimento fisiológico de fungos filamentosos, porém são indispensáveis para os micoparasitas biotróficos e destrutivos, como por exemplo *Sporidesmium sclerotivorum* (Fries, 1965; Barnett, 1970; Barnett & Ayres, 1981). Outros micoparasitas crescem, rapidamente em meio sintético sem vitaminas, como, por exemplo, *Trichoderma* spp. (Elad et al., 1981). Van den Boogert (1989) observou que o fungo *Verticillium biguttatum* cresceu axenicamente em meio líquido sintético com um composto contendo um grupo amino como fonte de N, glicose como fonte de C e biotina como fator de crescimento. A linhagem de *A. alternata*, em estudo, cresceu profusamente (1,28 cm/dia) em meio sintético básico contendo maltose + vitaminas (biotina ou piridoxina) + KNO_3 . A peptona, associada ao meio citado acima não teve um efeito positivo no crescimento vegetativo. O mesmo aconteceu com as outras fontes de C restantes, incluindo galactose e arabinose. A presença de peptona também inibiu a formação de conídios em todas as combinações testadas, tanto para fontes de C quanto N e vitamina. A peptona contém em sua composição todos os aminoácidos essenciais.

Tais resultados, sugerem que novas fontes de N e vitaminas devem ser testadas.

TABELA 3. Avaliação do crescimento micelial e esporulação de *Alternaria alternata* em meio sintético básico com diferentes fontes de nitrogênio (média de cinco repetições).

Fonte de nitrogênio	Taxa de crescimento micelial		Esporulação ($\times 10^{-3}$ conídios/mL)
	cm/dia ¹	\varnothing colônia ²	
KNO_3	0,72a	6,2	0,3
Glutamina	0,63b	6,2	0,0
NH_4Cl	0,60b	4,9	0,3

¹ Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade (DMS=0,07 e CV=5,98%).

² Médias (cm) tomadas aos sete dias de crescimento.

REFERÊNCIAS

- BARNETT, H.L. Nutritional requirements for axenic growth of some haustorial mycoparasites. **Mycologia**, v.62, p.750-760, 1970.
- BARNETT, E.A.; AYRES, W.A. Nutritional and environmental factors affecting growth and sporulation of *Sporidesmium sclerotivorum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.27, p.685-691, 1981.
- ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. **Phytoparasitica**, v.9, p.59-67, 1981.
- FRIES, N. The chemical environment for fungal growth. 3. Vitamins and other organic growth factors. In: AINSWORTH, G.C.; SUSSMAN, A.S. (Eds.). **The fungi, an advanced treatise**. New York: Academic Press, 1965. v.1, p.491-523.
- KOSTECKI, M.; GRABARKIEWCZ-SZCZESNA, J.; CHELKOWSKI, J. Biosynthesis and preparation of five *Alternaria* metabolites. **Mycotoxin Research**, v.7, p.3-7, 1991.
- MISAGHI, I.J.; GROGAN, R.G.; DUMIWAY, J.M.; KIMBLE, K.A. Influence of environment and culture media on spore morphology of *Alternaria alternata*. **Phytopathology**, v.68, p.29-34, 1978.
- SILVA, C.M.M.S. **Biodegradação do fungicida carbendazim**. Rio Claro: UNESP, 1996. 86p. Tese de Doutorado.
- UNGARO, M.R.G.; AZEVEDO, J.L. Crescimento e esporulação de *Alternaria alternata* em diferentes condições de cultivo. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, p.75-82, 1986.
- VAN DEN BOOGERT, P.H.J.F. Nutritional requirements of the mycoparasitic fungus *Verticillium biguttatum*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.95, p.149-156, 1989.