XXIX SEPE Simpósio de Ensino, Pesquisa e Extensão
Teaching, Research and Extension Symposium
Presente e futuro:
uso consciente da Inteligência Artificial
Today and tomorrow:
the conscious use of Artificial Intelligence
Resumo expandido
Extended abstract
ISSN: 2316-9745
20 A 22 DE OUTUBRO DE 2025
OCTOBER 20th to 22nd, 2025
UFN Universidade Franciscana Franciscan University

DOI: https://doi.org/10.48195/sepe2025.30130

MEIOS DE CULTIVO NO DESENVOLVIMENTO DO PATÓGENO CAUSADOR DA DOENÇA ANTRACNOSE EM NOGUEIRA CHILENA

Rafaela Gonçalves Caruso[1]; Lucas Graciolli Savian[2]; Alexsandra Cezimbra Quevedo[3]; Janaina Silva Sarzi[4]; Marisa Ana Strahl[5]; Leonardo Fellipe Da Silva Cruz Couto[6]; Laís Da Silva Martello[7]; Marlove Fátima Brião Muniz[8]

RESUMO

A antracnose ocasionada por *Colletotrichum nymphaeae* foi relatada recentemente no Brasil ocorrêndo em espécies da família Juglandaceae, com grande importância econômica para a região Sul. Entretanto, pouco se sabe sobre o desenvolvimento *in vitro* deste patógeno. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento de *C. nymphaeae* em diferentes meios de cultivo. Dois isolados foram cultivados em sete meios de cultura durante oito dias. O diâmetro das colônias foi aferido diariamente, e a esporulação avaliada ao final do teste. As maiores médias de crescimento micelial foram obtidas por ambos isolados no meio de cultura leite de coco-ágar, que não diferiu estatisticamente do V8CaCO3 e do MATHUR. Para a esporulação, as menores médias deram-se no meio de cultivo contendo farinha de milho. Todos os meios de cultura mostraram-se viáveis para a produção de inóculo.

Palavras-chave: Família Juglandaceae; *Colletotrichum nymphaeae*; Crescimento *in vitro*; esporulação.

ABSTRACT

Anthracnose caused by *Colletotrichum nymphaeae* was recently reported in Brazil, occurring in species of the Juglandaceae Family. Which is of great economic importance for the South region. However, little is known about the *in vitro* development of this pathogen. Therefore, the objective of this study was to evaluate the development of *C. nymphaeae* in different culture media. Two isolates were cultivated in seven culture media for eight days. Colony diameter was measured daily, and sporulation was evaluated at the end of the test. The highest mycelial growth averages were obtained by both isolates in the coconut milk-agar culture medium, which did not differ statistically

[1] Programa de Pós-Graduação em Agronomia - UFSM. caruso.rafaela@acad.ufsm.br
[2] Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal – UFAC. lucassavian@hotmail.com
[3] Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal – UFSM. alequevedo1997@gmail.com
[4] Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis - UFFS. janassarzi@gmail.com
[5] Programa de Pós-Graduação em Agronomia – UFSM. marisastrahl24@gmail.com
[6] Programa de pós graduação em Biologia Vegetal – UFMG. leonardo.couto@acad.ufsm.br
[7] Engenheira Agronoma – UFSM. laismartellos@gmail.com
[8] Orientadora. Professora do Departamento de Defesa Fitossanitária – UFSM. marlovemuniz@yahoo.com.br

ISSN: 2316-9745

from V8CaCO3 and MATHUR. For sporulation, the lowest averages occurred in the culture medium containing corn flour. All culture media were viable for inoculum production.

Keywords: Juglandaceae Family; *Colletotrichum nymphaeae*; *In vitro* growth; sporulation.

Eixo Temático: Sociedade e Ambiente.

1. INTRODUÇÃO

Colletotrichum é um gênero fúngico cosmopolita que causa antracnose em varias plantas comercialmente importante (KARIMI *et al*., 2016). *Colletotrichum nymphaeae* (Pass) Aa, é mencionada como a mais destrutiva (BARONCELLI *et al*., 2015), com grande relevância para culturas fruteiras de climas temperados e subtropicais, como macieira (*Malus domestica*), caquizeiro (*Diospyros kaki*) e pereira *Pyrus* spp) (VELHO *et al*. 2014; HASSAN *et al*., 2019; FU *et al*., 2019). O patógeno causa manchas necróticas em folhas e frutos, e em infestações graves, provoca desfolha e frutos defeituosos, resultando em perdas financeiras.

O controle da antracnose por variedades resistentes exige grande quantidade de inóculo para testes de resistência, além de cuidados com fatores abióticos que podem inibir o crescimento fúngico (BRUNELLI *et al*., 2006). *C. nymphaeae* tem crescimento lento em meio de cultura (VELHO *et al*., 2014) e há poucos estudos sobre suas condições ideais de desenvolvimento, dificultando a obtenção de inóculo. Este trabalho visa avaliar o crescimento in vitro de *C. nymphaeae* em diferentes meios de cultura.

2. METODOLOGIA

Isolados Fúngicos

Foram utilizados dois isolados de *C. nymphaeae* depositados na micoteca do laboratório de Fitopatologia Drª. Elocy Minussi, da Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil. Os isolados foram obtidos de frutos sintomáticos de *J. regia* e estavam armazenados em água destilada esterilizada. Na tabela a seguir (Tabela 1), estão dispostas mais informações sobre os isolados utilizados.

Tabela 1: Código na micoteca, código no GenBank e local da coleta de dois isolados de *Colletotrichum nymphaeae* utilizados neste trabalho.

ISSN: 2316-9745

Código do isolado na micoteca	Código GenBank		Local da coleta
	ACT*	β-TUB*	
AG02	MN103346	MN114081	28º53'35"S e 52º 02'45" O
AG05	MK953925	MK953924	

Onde: GenBank: Banco de sequências de nucleotídeos do National Center for Biotechnology Information; ACT: Actina; β-TUB: β-Tubulina. *Regiões do DNA sequenciadas.

Meios De Cultivo Utilizados

Para a avaliação do desenvolvimento, discos (7 mm) de meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar- BDA, contendo estruturas dos patógenos foram transferidos para placas de Petri (70 mm) contendo os seguintes meios de cultura: aveia-ágar (AVA) – 50 g de farinha de aveia, 15 g de ágar, 1000 mL de água destilada–; BDA – 39 g de meio sintético MERK®, 1000 mL de água destilada – ; leite de coco-ágar (LCA) – 200 mL de leite de coco, 20 g de dextrose, 20 g de ágar, 800 mL de água destilada – ; extrato de malte-ágar (EMA) – 20 g de extrato de malte, 20 g de ágar, 1000 mL de água destilada – ; MATHUR – 2,8 g de dextrose, 2,5 g de sulfato de magnésio puríssimo, 2,7 g de fosfato monopotássico 1 g de peptona, 0,8 g de extrato de levedura, 17 g de ágar, 1000 mL de água destilada– ; Farinha de milho-ágar (FMA) – 20 g de farinha de milho, 17 g de ágar e 1000 mL de água destilada e V8CaCO^3 – 100 mL de suco de vegetais Campbell's® V8, 2 g de carbonato de sódio, 20 g de ágar e 900 mL de água destilada.

Para cada tratamento foram feitas seis repetições e as placas encubadas em BOD (25ºC, 12h de fotoperíodo) durante oito dias. As colônias fúngicas foram mensuradas diariamente com um paquímetro digital e no oitavo dia, 10 mL de água destilada foram acrescentada em cada placa. A superfície do meio de cultura, foi raspada com uma alça de Drigalski. Na sequência, a suspensão foi filtrada em camada dupla de gaze estéril e acrescida de uma gota de Tween 80®. A suspensão foi agitada em vórtex durante 20 segundos e a concentrações (conídios. mL^{-1}) foi determinada em câmara de Neubauer e microscópio ótico.

Procedimento Estatístico

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo as médias finais de crescimento micelial (diâmetro final da colônia) e esporulação submetidas à análise de

ISSN: 2316-9745

variância, pelo teste estatístico de Skott-Knott ($p<0,05$), usando o programa de análise estatística SISVAR (FERREIRA, 2014). Além disso, no mesmo programa, os dados de crescimento foram submetidos a análise de regressão polinomial em função do tempo (dias). Foram testados os modelos linear, quadrático e cúbico, sendo selecionado o modelo significativo de maior ordem para explicar os resultados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Houve diferença entre os meios de cultura e os isolados fúngicos (Tabela 2). O isolado AG02 teve maior crescimento no meio LCA (67,89 mm), sem diferença estatística com MATHUR (67,20 mm) e V8CaCO3 (64,20 mm). FMA e EMA apresentaram crescimento intermediário, e BDA (46,44 mm) e AVA (51,05 mm) as menores médias. O isolado AG05 mostrou comportamento semelhante, com maior crescimento nos meios V8CaCO3, MATHUR e LCA, e BDA novamente apresentando as menores médias.

Tabela 2: Diâmetro final da colônia (mm) de dois isolados de *C. nymphaeae* aos oito dias de incubação.

ISOLADOS	Diâmetro final da colônia (mm)						
	MEIOS DE CULTIVO						
	AVA	BDA	LCA	EMA	MATHUR	FMA	$V8CaCO_3$
AG02	51,05cB*	46,44cA	67,89aA	59,28bA	67,20aA	59,60bA	64,20aB
AG05	59,65bA	45,45cA	65,83aA	58,75bA	67,40aA	59,91bA	69,75aA
CV (%)	6,91						

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Skott-Knott ($p<0,05\%$). Onde: AVA: aveia-ágar; BDA: batata dextrose-ágar; LCA: leite de coco-ágar; EMA: extrato de malte-ágar; FMA: farinha de milho-ágar; $V8CaCO_3$: suco de vegetais enriquecido com carbonato de cálcio; CV (%): coeficiente de variação.

Quando se compara os isolados de *C. nymphaeae* pode-se perceber que, de maneira geral, os isolados apresentaram comportamento parecido, uma vez que não diferiram estatisticamente, com exceção do $V8CaCO_3$ e BDA. Em ambos os casos, as menores médias foram obtidas pelo isolado AG02.

Apesar de *C. nymphaeae* ser um patógeno importante de fruteiras ao redor do mundo, os estudos abordando o desenvolvimento de *C. nymphaeae* em diferentes meios de cultivo são

ISSN: 2316-9745

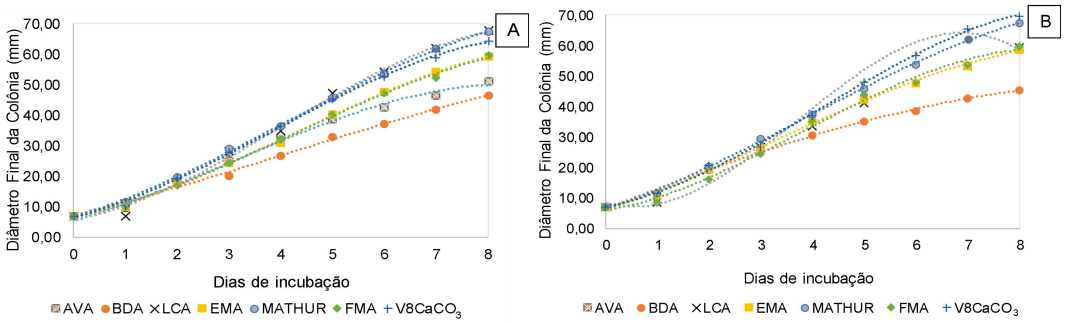
raros, como no caso de Oo *et al*. (2018), que trabalharam com a identificação e a caracterização de espécies de *Colletotrichum* associadas à doença da podridão amarga da maçã (*Malus domestica*) na Coreia do Sul. Os autores constataram variação no crescimento de *C. nymphaeae* de acordo com o meio de cultivo. No meio BDA, segundo os autores, as colônias apresentaram crescimento de 32,00 a 35,00 mm. semana^{-1}, enquanto que em V8, as médias variaram de 41,00 a 44,00 mm. semana^{-1} para os mesmos isolados. López-Moral *et al.* (2017), avaliando o crescimento de *Colletotrichum* spp., constataram um crescimento semanal maior, 6,40 mm.dia^{-1} (51,20 mm. semana^{-1}) para *C. nymphaeae*, em BDA, obtido de oliveiras (*olea europea*) na Espanha.

Outros autores vêm trabalhando com espécies do complexo *C. acutatum* da qual *C. nymphaeae* faz parte. Chidichima *et al*. (2018), por exemplo, avaliaram o crescimento micelial de *C. acutatum* em seis meios de cultivo, dentre eles BDA e AVA, constatando que as menores médias apresentadas por *C. acutatum* foram no meio BDA, em conformidade com nosso estudo. Outros estudos com o gênero, como o de Soltani *et al.,* (2014), que avaliaram o desenvolvimento de *C. gloeosporioides* em diversos fatores, dentre eles meios de cultura, constataram diferença estatística entre as médias obtidas pelo patógeno nos diferentes meios de cultura.

Na figura a seguir (Figura 1) é possível observar que até o terceiro dia de incubação as colônias nos diferentes meios de cultivo apresentam médias de crescimento micelial semelhante. A partir do quarto dia, tanto para o isolado AG02 (A) como para o isolado AG05 (B) as médias de crescimento no meio de cultivo BDA passam a apresentar menor incremento relativo, o que resultou em um diâmetro visivelmente menor quando comparado com os demais tratamentos, ao final dos oito dias de incubação.

Figura 1: Representação gráfica do diâmetro da colônia de dois isolados de *C. nymphaeae* em sete meios de cultura e oito dias de crescimento.

ISSN: 2316-9745



Onde: A: diâmetro da colônia do isolado de *C. nymphaeae* AG02; B: diâmetro da colônia do isolado de *C. nymphaeae* AG05. Linhas pontilhadas indicam linha de tendência de crescimento micelial.

De acordo com os dados de crescimento micelial, verificou-se que os isolados de *C. nymphaeae* nos diferentes meios de cultura apresentam tendência cúbica entre o diâmetro da colônia e o tempo (dias). Na tabela 3 estão dispostos as equações e o valor de R^2 para os isolados nos meios de cultura.

Tabela 3: Coeficientes do modelo cúbico e valor do coeficiente de determinação (R^2) para dois isolados de *C. nymphaeae* em sete meios de cultivo.

	MEIO DE CULTIVO	EQUAÇÃO	R^2
AG02	AVA	$-0,0852x^3 + 0,78x^2 + 4,7974x + 5,2193$	0,9889
	BDA	$-0,0238x^3 - 0,2797x^2 + 4,2136x + 6,9278$	0,9961
	LCA	$-0,1476x^3 + 1,7907x^2 - 2,80006x + 5,6601$	0,9952
	EMA	$-0,0898x^3 + 1,1488x^2 + 3,1222x + 6,7433$	0,9992
	MATHUR	$-0,079x^3 + 1x^2 + 3,6301x + 6,3402$	0,998
	FMA	$-0,0855x^3 + 1,0394x^2 + 4,7386x + 6,6792$	0,9994
	$V8CaCO_3$	$-0,1096x^3 + 1,2522x^2 + 4,1879x + 6,3968$	0,9992
AG05	AVA	$-0,1395x^3 + 1,5972x^2 + 2,7306x + 5,9532$	0,9942

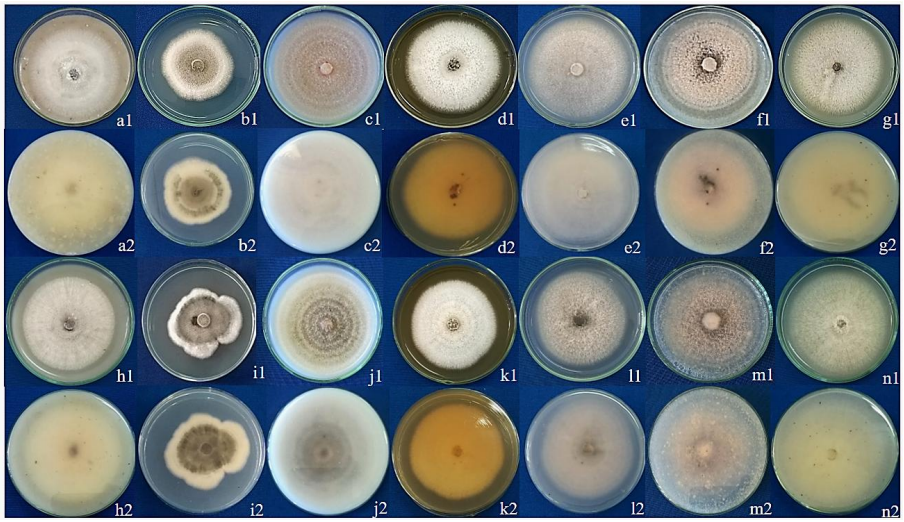
ISSN: 2316-9745

BDA	$-0,0098x^3 - 0,1647x^2 + 6,8072x + 6,4054$	0,9979
LCA	$-0,4464x^3 + 4,9777x^2 - 5,0145x + 8,4765$	0,8495
EMA	$-0,0691x^3 + 0,6931x^2 + 5,3739x + 6,2959$	0,9983
MATHUR	$-0,075x^3 + 0,8664x^2 + 5,481x + 6,5053$	0,9993
FMA	$-0,1395x^3 + 1,5972x^2 + 2,7306x + 5,9532$	0,9942
$V8CaCO_3$	$-0,1351x^3 + 1,6763x^2 + 3,1127x + 7,2549$	0,9984

Onde: AVA: aveia-ágar; BDA: batata dextrose-ágar; LCA: leite de coco-ágar; EMA: extrato de malte-ágar; FMA: farinha de milho-ágar; $V8CaCO_3$: suco de vegetais enriquecido com carbonato de cálcio.

Na figura 2 estão dispostos os isolados de *C. nymphaeae* nos meios de cultura utilizados. Nela, é possível constatar que os isolados apresentaram aspecto e coloração da colônia distintos. Em meio de cultura AVA, ambos apresentaram micélio aéreo cotonoso, de coloração branca. Em BDA, as colônias apresentaram variação na coloração do micélio, quando jovem, este possui coloração branca, adquirindo coloração amarronzada na medida que se passavam os dias. Para os meios LCA e FMA, foi possível a constatação da formação de acérvulos pelos isolados, representados pelas pontuações escuras na imagem.

Figura 2: Vista superior e inferior de colônias de *C. nymphaeae* aos oito dias de incubação em sete meios de cultura.



Onde: da esquerda para a direita: AVA, BDA, LCA, EMA, MATHUR, FMA e V8CACO$_3$. a1-g2: Isolado AG02. h1-n2: isolado AG05. Letra seguida do numeral 1 indica vista superior da colônia, letra seguida do numeral 2 indica vista da parte inferior da colônia.

Para a variável esporulação (Tabela 4), houve diferença entre os meios de cultura e os isolados fúngicos. No meio de cultura BDA, o isolado AG02 apresentou 7,01 x 10^5 conidios.ml^{-1}, diferindo estatisticamente de todos os outros meios de cultivo.

Tabela 4: Esporulação de *C. nymphaeae* em sete meios de cultivo e oito dias de incubação.

	Esporulação (x10^5 conidios.ml^{-1})						
ISOLADOS	MEIOS DE CULTIVO						
	AVA	BDA	LCA	EMA	MATHUR	FMA	V8CaCO$_3$
AG02	2,16cB*	7,01aA	3,82bA	3,91bA	2,13cA	1,57cA	2,21cA
AG05	8,74aA	2,93bB	2,53bB	3,65bA	3,24bA	0,62cA	2,12bA
CV (%)	29,45						

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Skott-Knott ($p<0,05\%$). Onde: AVA: aveia-ágar; BDA: batata dextrose-ágar; LCA: leite de coco-ágar; EMA: extrato de malte-ágar; FMA: farinha de milho-ágar; V8CaCO$_3$: suco de vegetais enriquecido com carbonato de cálcio; CV (%): coeficiente de variação.

Para a esporulação do isolado AG02, foram identificados dois grupos. O primeiro, com esporulação intermediária, inclui os meios EMA (3,91 x 10^5 conídios.ml^{-1}) e LCA (3,82 x 10^5 conídios.ml^{-1}). O segundo grupo, com esporulação menor, abrange os meios FMA (1,57 x 10^5 conídios.ml^{-1}), MATHUR (2,13 x 10^5 conídios.ml^{-1}), AVA (2,16 x 10^5 conídios.ml^{-1}) e V8CaCO$_3$ (2,21 x 10^5 conídios.ml^{-1}), sem diferença estatística entre os meios de cada grupo.

O isolado AG05 apresentou maior esporulação no meio AVA (8,74 x 10^5 conídios.ml^{-1}), enquanto o FMA registrou a menor esporulação (0,62 x 10^5 conídios.ml^{-1}). Os meios EMA (3,65 x 10^5 conídios.ml^{-1}), MATHUR (3,24 x 10^5 conídios.ml^{-1}), BDA (2,93 x 10^5 conídios.ml^{-1}), LCA (2,53 x 10^5 conídios.ml^{-1}) e V8CaCO$_3$ (2,12 x 10^5 conídios.ml^{-1}) formaram um grupo intermediário, sem diferenças estatísticas.

Ao analisar os isolados, não houve diferença entre eles nos meios EMA, MATHUR, FMA e V8CaCO$_3$. No entanto, AG02 apresentou maiores médias nos meios LCA e BDA,

ISSN: 2316-9745

enquanto AG05 se destacou no meio AVA.

Es-Soufi *et al.* (2018) avaliaram a esporulação de *C. acutatum* em folhas de morangueiro em cinco meios de cultura, incluindo PDA e EMA, e observaram maior esporulação no PDA, resultado similar ao obtido para o isolado AG02. Oliveira, Bonaldo e Trento (2011) não encontraram diferenças significativas entre as esporulações de *Colletotrichum* sp. em teca nos meios BDA, AVA e V8, enquanto que Soltani *et al*. (2014) identificaram diferenças significativas entre as esporulações de *C. Gloeosporioides* em diferentes meios.

4. CONCLUSÃO

Todos os meios de cultivo utilizados foram capazes de proporcionar o desenvolvimento *in vitro* de *C. nymphaeae* sendo indicados para a produção massal de inóculo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) pela concessão da bolsa de estudos do primeiro autor e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade do Orientador.

REFERÊNCIAS

BARONCELLI, R. e*t al*. Molecular diversity of anthracnose pathogen populations associated with U.K strawberry production suggests multiple introductions of three different *Colletotrichum* species. **PLoS One,** v. 10, n. 6, e0129140, 2015.

BRUNELLI, K. R. *et al*. Efeito do meio de cultura e do regime de luz na esporulação de *Cercospora zeae-maydis*. **Summa Phytopathologica,** v. 32, n. 1, p. 92-94, 2006.

CHIDICHIMA, L. P. DA S. *et al.* Crescimento e etiologia do agente causal da antracnose em morangueiro. **Acta Iguazu,** v. 7, n. 4, p. 24-34, 2018.

ES-SOUFI, R. *et al*. Biology and Physiology of *Colletotrichum acutatum* Strains Causing Strawberry's Anthracnose. **Agricultural Sciences**, v. 9, n. 8, p. 974-990, 2018.

FERREIRA, D. F. Sisvar: A Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

FU, M. *et al*. *Colletotrichum* species associated with anthracnose of *Pyrus* spp. in China. Persoonia: **Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 42, p. 1-35, 2019.

HASSAN, O. LEE, D. W. CHANG, T. First report of anthracnose of persimmon caused by *Colletotrichum nymphaeae* in Korea. **Plant Disease**, v. 103, n. 7, p. 1772-1772, 2019.

KARIMI, K. *et al*. Funneliformis mosseae root colonization affects *Anethum graveolens* essential oil composition and its efficacy against *Colletotrichum nymphaeae*. **Industrial Crops and Products**, v. 90, p. 126-134, 2016.

LÓPEZ-MORAL, A. *et al.* Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing almond anthracnose in Spain. **Plant disease**, v. 101, n. 12, p. 2034-2045, 2017.

OLIVEIRA, J.; BONALDO, S.; TRENTO, R. A. Desenvolvimento de *Colletotrichum* sp. isolado de teca em diferentes meios de cultura. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 13, 2011.

OO, M. M. *et al*. Identification and characterization of *Colletotrichum* species associated with bitter rot disease of apple in South Korea. **The plant pathology journal**, v. 34, n. 6, p. 480, 2018.

SAVIAN, L. G. *et al.* First report of *Colletotrichum nymphaeae* causing anthracnose on *Juglans regia* fruits in southern Brazil. **Plant Disease**, v. 103, n. 12, p. 3287, 2019.

SOLTANI, J. *et al.* Light, temperature, and aging dependent vegetative growth and sporulation of Colletotrichum gloeosporioides on different culture media. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 8, n. 4, p. 208-216, 2014.

VELHO, A. C. *et al.* First report of *Colletotrichum nymphaeae* causing apple bitter rot in southern Brazil. Plant disease, v. 98, n. 4, p. 567-567, 2014.

VELHO, A. C. *et al.* New insights into the characterization of *Colletotrichum* species associated with apple diseases in southern Brazil and Uruguay. **Fungal Biology**, v. 119, n. 4, p. 229-244, 2015.