

Restrição hídrica na inoculação artificial de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho

L. S. Barros¹; S. C. Guimarães¹; L. Kobayashi¹; E. A. F. Mendonça¹

¹Departamento de Fitossanidade, Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, 7806090, Cuiabá-MT, Brasil

AgriLilianebarros@yahoo.com.br

(Recebido em 25 de novembro de 2013; aceito em 30 de junho de 2014)

A restrição hídrica tem sido utilizada nos meios de cultura com o objetivo de inibir ou retardar a germinação das sementes e permitir maior exposição dessas a um inóculo, desde que o potencial osmótico do meio restrinja a germinação das sementes e não prejudique o desenvolvimento das colônias do patógeno. Visando a inoculação de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho, foram avaliados os efeitos da restrição hídrica em meio BDA (batata-dextrose-ágar) +KCl e BDA+NaCl nos potenciais de -0,6; -0,8; -1,0; -1,2; MPa, sobre o crescimento micelial e produção de conídios de *F. verticillioides*, porcentagem de sementes infectadas, germinação das sementes inoculadas e transmissão do fungo em milho. Não houve diferença significativa para produção de conídios de *F. verticillioides* e germinação de sementes inoculadas. O meio BDA+KCl entre -0,6 e -1,0 MPa e, BDA+NaCl de -0,6 e -0,8 MPa favorece o crescimento micelial de *F. verticillioides*. A técnica de restrição hídrica utilizando os solutos NaCl e KCl é eficiente na inoculação artificial de sementes de milho com *F. verticillioides*. O meio BDA+NaCl e BDA+KCl, ambos no potencial de -1,2 MPa, permite 90% de transmissibilidade de *F. verticillioides* de sementes inoculadas para colmos e raízes de milho.

Palavras-chave: *Zea mays*, condicionamento osmótico, transmissão.

Water Restriction on artificial inoculation for *Fusarium verticillioides* in corn seeds

Water restriction has been used in the culture media in order to inhibit or delay germination to allow for greater exposure to an inoculum, as long as the osmotic potential of the media restricts seed germination and is not detrimental to the development of pathogen colonies. To achieve the inoculation of *Fusarium verticillioides* in corn seeds the effects of water restriction using PDA (potato dextrose agar) + KCl and PDA + NaCl at concentration producing osmotic potentials of -0,6; -0,8; -1,0 and -1,2 MPa, on mycelial growth and conidial production of *F. verticillioides*, percentage of infected seeds, germination of seeds and transmission of the fungus to the corn was evaluated. There was no significant difference for conidial production of *F. verticillioides* and seeds germination. The PDA + KCl medium with osmotic potential between -0,6 and -1,0 MPa and PDA + NaCl with osmotic potential of -0,6 and -0,8 MPa favors the mycelial growth of *F. verticillioides*. The technique of using water restriction with NaCl and KCl solutes is effective in artificial inoculation of maize seeds with *F. verticillioides*. The PDA +NaCl and PDA + KCl medium, both in the osmotic potential of -1,2 MPa, allows 90% of transmissibility of *F. verticillioides* inoculated seeds to the corn stems and roots.

Key words: *Zea mays*, osmotic conditioning, transmission

1. INTRODUÇÃO

O milho é uma cultura de grande importância econômica no Brasil e, devido ao aumento de produtividade, tem se observado maior interesse dos pesquisadores no controle de patógenos que são comumente encontrados na cultura, dentre esses, o *Fusarium verticillioides*.

Esse patógeno é considerado um dos principais responsáveis pelo apodrecimento das sementes, baixos índices de vigor e germinação, aceleração do processo de deterioração durante o armazenamento [6, 7], além da produção de micotoxinas que causam doenças denominadas micotoxicoses quando os grãos contaminados são ingeridos [4].

Em diversos estudos de epidemiologia faz-se necessário o uso de sementes infectadas com patógenos, em diferentes graus de contaminação. Para isso, tem sido usados métodos de inoculação em plantas adultas, imersão de sementes em suspensão de conídios e contato de sementes com a colônia de fungos em desenvolvimento, porém, esses métodos têm sido questionados por permitirem baixos índices de transmissibilidade do patógeno ou mesmo

resultar em germinação das sementes, ainda em contato com o fungo durante o período de inoculação artificial, devido o período de tempo de exposição das mesmas ao inóculo do fungo [2].

Além dos métodos mencionados, o uso da restrição hídrica ou condicionamento fisiológico em meio de cultura de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) tem sido utilizado para inoculação de alguns fungos em sementes com a vantagem de permitir maior exposição dessas ao inóculo, desde que o potencial osmótico do meio restrinja a germinação das sementes e não prejudique o desenvolvimento das colônias do patógeno [7].

A técnica da restrição hídrica em meio de cultura já foi comprovada como sendo eficaz para a inoculação de vários fungos fitopatogênicos em diversas culturas [2, 7]. No entanto, o potencial osmótico e as substâncias utilizadas para promover a restrição hídrica, são variáveis entre espécies de fungos e de sementes.

Para tanto, o objetivo desse trabalho, foi avaliar a eficácia da técnica da restrição hídrica em meio BDA com a utilização de NaCl e KCl na inoculação artificial de sementes de milho com *F. verticillioides* e sua transmissão.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As sementes de milho utilizadas foram do híbrido AS1590YG, obtidos pela Empresa Monsanto e o fungo *F. verticillioides* foi isolado de sementes de milho e mantido em placa de Petri contendo meio BDA.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 2 (cinco potenciais e dois solutos) para avaliação da germinação de sementes de milho, crescimento micelial, quantificação de conídios e sanidade, e fatorial 6 x 2 (cinco potenciais + semente não inoculada e dois solutos) para avaliação da transmissibilidade.

Para inocular as sementes, o meio de cultura utilizado foi o meio sólido BDA utilizando NaCl e KCl separadamente nos potenciais de -0,6; -0,8; -1,0; -1,2 MPa, obtido por meio da fórmula de Van't Hoff, citado por Salisbury e Ross [11], mais a testemunha BDA (-0,35 MPa = água pura), sem adição dos restritores. Foram retirados discos de 0,5 cm de diâmetro das bordas das colônias de *F. verticillioides* e transferidas para o centro de placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo BDA+tratamento. Essas placas foram incubadas a 25 °C em fotoperíodo de 12 horas.

Após sete dias, as sementes de milho foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 2% por 1 minuto, enxaguadas em água destilada esterilizada, e colocadas em contato com a placa de Petri contendo o fungo desenvolvido em meio contendo o restritor (BDA+tratamento). As sementes foram colocadas em camada única por toda placa de Petri onde permaneceram até que pelo menos uma semente iniciasse o processo de germinação, que ocorreu em 24; 25; 25,5; 28 e 29 h para os respectivos potenciais osmóticos de -0,35; -0,6; -0,8; -1,0 e -1,2 MPa utilizando o soluto KCl e 24 h para o potencial de -0,35, 26 h para -0,6; -0,8; -1,0 e 27h para o potencial de -1,2 MPa. Após os períodos de exposição, estas sementes já inoculadas, foram colocadas para secar sobre folhas de papel filtro por 24 h, em condições assépticas.

Para avaliação da germinação, as sementes inoculadas foram acondicionadas em papel toalha tipo "germistest", na forma de rolo, umedecidos com água destilada na quantidade de 2,5 vezes a massa do papel, sendo quatro repetições de 50 sementes por tratamento. Os rolos foram levados a germinador regulado com temperatura de 25 °C por quatro dias [1], quando foram observadas as plântulas normais, plântulas anormais e sementes não germinadas.

O crescimento micelial foi avaliado utilizando meio BDA+NaCl e BDA+KCl, nos potenciais de -0,6; -0,8; -1,0; -1,2 MPa, mais a testemunha BDA puro (-0,35 MPa). Foram retirados discos de 0,5 cm de diâmetro das bordas das colônias de *F. verticillioides* e transferidas para o centro de placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo BDA+tratamento e mantidos até que 50% das parcelas de algum dos tratamentos tomasse $\frac{3}{4}$ da placa. Foram utilizadas quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição uma placa. A avaliação diária foi realizada por meio da medição dos diâmetros das colônias nos dois sentidos perpendiculares, tomando-se como valor de crescimento a média dos dois eixos.

Para quantificação do número de conídios nos diferentes meios, foram adicionados 10 mL de água destilada à placa de Petri. A suspensão de conídios obtida foi filtrada em dupla camada de gaze. Três repetições foram utilizadas para determinar a concentração de conídios, cada repetição foi representada por três alíquotas de cada placa e a contagem foi feita com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio.

Para a sanidade das sementes inoculadas, foram utilizadas oito repetições de 25 sementes, desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2% por um minuto e enxaguadas em água destilada e esterilizada antes da incubação a 25° C pelo método Blotter Test em regime alternado de 12 horas de luz por sete dias. A presença do fungo foi avaliada com auxílio de microscópio estereoscópio.

O teste de transmissibilidade foi realizado em casa-de-vegetação por meio do plantio das sementes inoculadas artificialmente, em vasos de 2,5 L de solo estéril. As plantas foram mantidas por 26 dias após a germinação. Estas então foram coletadas, feita a separação de colmo e raízes com auxílio de tesoura e desinfestação superficial de todo material com álcool, hipoclorito de sódio a 2% e água destilada esterilizada. Depois foram incubadas em câmara úmida a ± 25 °C por 7 dias com 12 h de fotoperíodo para identificação da colônia fúngica formada, após a esporulação do patógeno, com auxílio de microscópios estereoscópio e ótico. A testemunha foi constituída por sementes não submetidas ao processo de inoculação. Foram utilizadas quatro repetições, sendo cada repetição composta por três vasos com duas plantas cada.

Os resultados foram submetidos a análise de variância pelo teste F e as médias dos tratamentos foram comparados pelo teste Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve redução na germinação das sementes inoculadas sugerindo que qualquer potencial utilizado com BDA+NaCl ou BDA+KCl, pode ser utilizado sem causar danos à semente, concordando com os resultados de Machado et al. ^[7] com inoculação de *F. moniliforme* em sementes de milho em solução de manitol. Porém, Teixeira e Machado ^[13] observaram redução na germinação ao utilizar BDA+Manitol com -1,2 MPa na inoculação de *Acremonium strictum* quando a semente de milho foi exposta por mais de 72 h à colônia fúngica.

Na sanidade das sementes inoculadas (Figura 1), observou-se que com o uso de BDA+KCl, a infecção pelo fungo foi alcançada de forma gradativa e crescente, pois nos potenciais de -1,0 e -1,2 MPa, obteve-se 86 e 90,5% de sementes de milho infectadas. Para BDA+NaCl, a porcentagem de sementes infectadas diferiu apenas da testemunha. A diferenciação entre os meios+solutos ocorreram nos potenciais de -0,6 e -0,8 MPa, ocorrendo maior infecção quando utilizado NaCl.

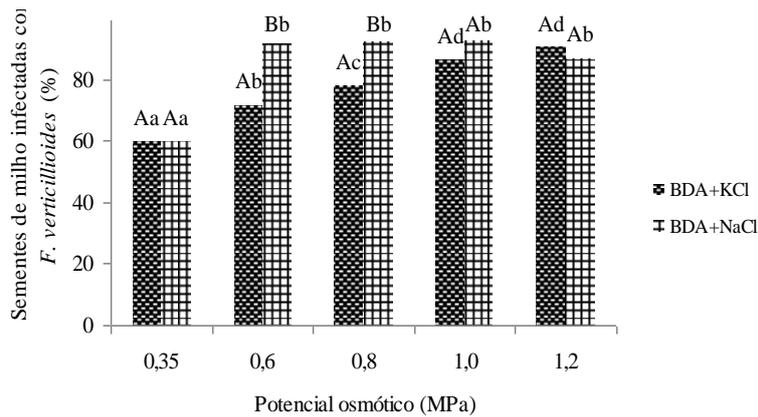


Figura 1. Porcentagem de sementes de milho infectadas com *Fusarium verticillioides* em diferentes níveis de potencial osmótico nos meios de cultura batata-dextrose-ágar+NaCl e batata-dextrose-ágar+KCl. UFMT, Cuiabá, MT, 2011. T = testemunha. Médias seguidas de mesma letra minúscula comparam potencial osmótico, letra maiúscula compara batata-dextrose-ágar+solutos, e não diferem entre si pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade

Mesmo sem restrição hídrica houve inoculação de 59% das sementes. Isso sugere que o patógeno apresenta crescimento rápido e penetra facilmente nos tecidos protetores da semente [7].

Houve comportamento diferenciado do crescimento micelial de *F. verticillioides* em relação ao potencial osmótico e solutos utilizados enquanto que para a produção de conídios, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Verificou-se que os maiores crescimentos miceliais ocorreram nos meios BDA+KCl de -0,6 a -1,0 MPa e BDA+NaCl em -0,6 e -0,8 MPa (Figura 2).

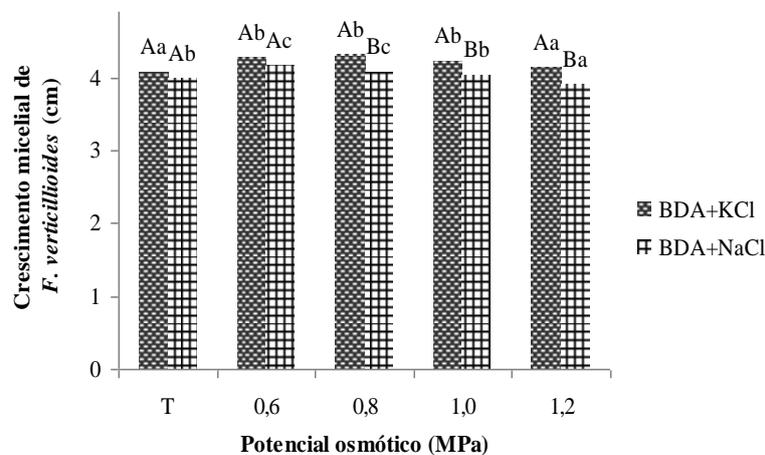


Figura 2. Crescimento micelial (cm) de *Fusarium verticillioides* em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) modificado com os solutos KCl e NaCl. UFMT, Cuiabá, MT, 2011. T = testemunha. Médias seguidas de mesma letra minúscula comparam potencial osmótico, letra maiúscula comparam batata-dextrose-ágar+solutos e não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade

Para cada microrganismo existe uma faixa adequada de potencial hídrico para o seu crescimento e meios de cultura osmoticamente modificados, pois estes diferem na habilidade de absorver água do ambiente [2, 3].

Os potenciais entre -0,6 e -1,0 MPa estimularam o desenvolvimento da colônia fúngica de *F. verticillioides* quando utilizado BDA+KCl. No potencial de -1,2 MPa o crescimento micelial foi de 4,14 cm, semelhante a utilização de BDA padrão que obteve 4,09 cm. Já para BDA+NaCl, os maiores crescimentos ocorreram nos potenciais de -0,6 e -0,8 MPa. Semelhante aos resultados encontrados por [8] quando *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* foi estimulado, visto que,

no meio sem restrição hídrica, o índice do crescimento micelial foi menor que nos demais potenciais.

O crescimento de *F. verticillioides* foi favorecido no meio BDA+KCl entre os potenciais de -0,8 à -1,2 MPa, já para *Bipolaris sorokiniana*, o crescimento micelial foi estimulado até -0,8 MPa utilizando o mesmo soluto ^[5].

A transmissão de *F. verticillioides* a partir das sementes inoculadas obteve resultado significativo apenas entre os potenciais osmóticos (Figura 3).

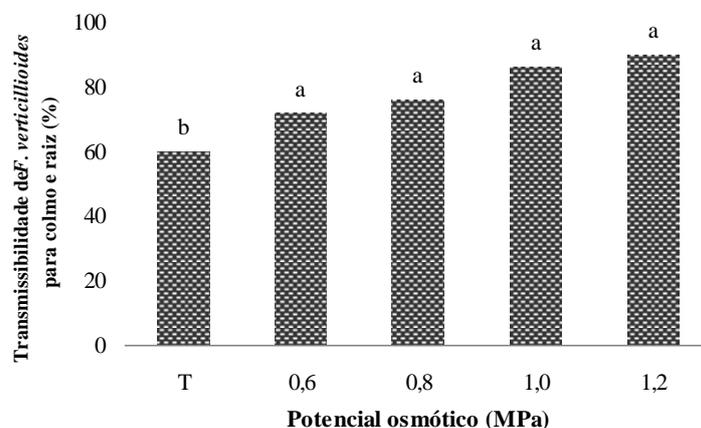


Figura 3. Transmissibilidade de *Fusarium verticillioides*, via semente inoculada artificialmente nos meios de cultura batata-dextrose-ágar+NaCl e batata-dextrose-ágar+KCl, em diferentes potenciais hídricos, para colmo e raiz de milho. UFMT, Cuiabá, MT, 2011. T= testemunha (semente sem inoculação). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade

No potencial de -1,2 MPa foi observado 90% de transmissibilidade de *F. verticillioides* das sementes para os colmos e raízes das plantas de milho, diferindo apenas da testemunha.

O patógeno estava presente nas partes vegetais não apresentando sintoma visual e nenhum dano no desenvolvimento da planta no período estudado. Provavelmente com a evolução da doença, os tecidos dos nós do colmo poderiam ser colonizados, causando podridão da base do colmo ^[12].

No patossistema *Colletotrichum lindemuthianum* e feijoeiro, ^[9] verificaram 80% de transmissão e as plantas apresentaram sintomas visuais no sistema radicular, enquanto ^[13] observaram 73% de transmissibilidade de *Acremonium strictum* e 99% das plantas obtiveram o patógeno no colmo e raízes de milho, com sintomas visuais a partir de 28 dias de idade.

4. CONCLUSÕES

O meio BDA+KCl entre -0,6 e -1,0 MPa e, BDA+NaCl de -0,6 e -0,8 MPa favorece o crescimento micelial de *F. verticillioides*.

A técnica de restrição hídrica utilizando os solutos NaCl e KCl é eficiente na inoculação artificial de sementes de milho com *F. verticillioides*.

O meio BDA+NaCl e BDA+KCl, ambos no potencial de -1,2 MPa, permite 90% de transmissibilidade de *F. verticillioides* de sementes inoculadas para colmos e raízes de milho.

1. Brasil. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para Análise de Sementes. Brasília, 2009. 399p. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/images/MAPA/arquivos_portal/Regras_Analise%20_Sementes.pdf
2. Carvalho JCB. Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Lavras, 1999. 98f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras.
3. Coutinho WM; Machado JC; Guimarães MG; et al. 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, Brasília. 2001; 23(2):127-135. Disponível em: <http://www.abrates.org.br/revista/artigos/2001/v23n2/artigo19.pdf>
4. Embrapa. Reação de Cultivares com Relação à Produção de Grãos Ardidos em Milho. Sete Lagoas, 2007. 4p. (Boletim Técnico, 144). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/482105/1/Com144.pdf>
 5. Farias CRJ; Del Ponte EM; Correa CL; et al. Crescimento radial de *Bipolaris sorokiniana* em resposta a indução de restrição hídrica por solutos osmóticos em meio agarizado. Revista Brasileira Agrociência, Pelotas. 2004; 4(4):457-460. Disponível em: <http://www.ufpel.tche.br/faem/agrociencia/v10n4/artigo09.pdf>
 6. Goulart ACP; Fialho WFB. Incidência e controle de *Fusarium moniliforme* Sheldon em sementes de milho. Revista brasileira de Sementes, Brasília. 1999; 21(1):216-222. Disponível em: <http://www.abrates.org.br/revista/artigos/1999/v21n1/artigo32.pdf>
 7. Machado JC; Oliveira JA; Vieira MGGC; et al. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. Revista Brasileira de Sementes, Brasília. 2001a; 23(2):88- 94. Disponível em: <http://www.abrates.org.br/revista/artigos/2001/v23n2/artigo12.pdf>
 8. Machado JC. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). Revista Brasileira de Sementes, Brasília. 2004; 26(1):62-67. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-31222004000100010&script=sci_arttext
 9. Rey MS; Lima NB; Santos J; et al. Transmissão semente – plântula de *Colletotrichum lindemuthianum* em feijão (*Phaseolus vulgaris*). Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo. 2011; 76(3):465-470. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v76_3/rei.pdf
 10. Reis HF; Goulart ACP. Associação de *Cercospora kikuchii* com sementes de soja com "mancha púrpura". Fitopatologia Brasileira, Brasília. 1998; 23:274. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000090&pid=S0101-3122200500020002600014&lng=en
 11. Salisbury FB; Ross CW. Plant physiology. 4. ed. Belmont: Wandworth, 1991. 682p.
 12. Sartori AF; Reis, EM; Casa RT. Quantificação de transmissão de *Fusarium moniliforme* de sementes para plântulas de milho. Fitopatologia Brasileira, Brasília. 2004; 29(4):456-458. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-41582004000400018&script=sci_arttext
 13. Teixeira H; Machado JC. Transmissibilidade e efeito de *Acremonium strictum* em sementes de milho. Ciência e Agrotecnologia, Lavras. 2003; 27(5):1045-1052. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-70542003000500011&script=sci_arttext