

# Comparação de métodos para a detecção de *Fusarium graminearum* em sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.)\*

Daniel Garcia Júnior<sup>1</sup>; Marta Helena Vechiato<sup>2</sup>; José Otávio Machado Menten<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 13418-900, Piracicaba-SP; <sup>2</sup>CPDSV/Instituto Biológico, São Paulo/SP, e-mail: daniel.junior2006@ig.com.br

\* Parte da tese de doutorado do primeiro autor

Autor para correspondência: Marta Helena Vechiato

Data de chegada: 08/02/2006. Aceito para publicação em: 06/12/2007

1322

## RESUMO

Garcia Júnior, D.; Vechiato, M.H.; Menten, J. O.M. Comparação de métodos para a detecção de *Fusarium graminearum* em sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Summa Phytopathologica*, v.34, n.2, p.164-167, 2008

O objetivo deste trabalho foi comparar diferentes métodos utilizados para a detecção de *Fusarium graminearum* em sementes de trigo. Foram empregados 22 tratamentos: papel de filtro (PFC) com congelamento; papel de filtro (PF); PF mais 0,02% de 2,4 - D; meio semi-seletivo (MSS); MSS mais 0,02% de 2,4 - D; MSS mais KCl (-0,8 MPa); KCl, NaCl, manitol e sacarose nos potenciais osmóticos de -0,4, -0,6, -0,8 e -1,0 MPa. O delineamento

estatístico empregado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições (duas placas mais substrato com 25 sementes cada/repetição). Não houve diferenças significativas entre os diferentes métodos empregados e o método do PF com congelamento das sementes, considerado o método padrão para o teste de sanidade de sementes de gramíneas, na detecção de *F. graminearum* em sementes de trigo.

Palavras-chave adicionais: Giberela; métodos de detecção; meio semi-seletivo; restritores hídricos.

## ABSTRACT

Garcia Júnior, D.; Vechiato, M.H.; Menten, J. O.M. Comparison of methods for *Fusarium graminearum* detection in seeds wheat (*Triticum aestivum* L.). *Summa Phytopathologica*, v.34, n.2, p.164-167, 2008

The objective of this work was to compare different methods used in seed health testing for detection of *Fusarium graminearum* in wheat seeds. Twenty two treatments had been used: blotter test (BTDF) deep freezing; blotter test (BT); BT more 0.02% of 2,4-D; media half-selective (MSS); MSS more 0.02% of 2,4 - D ; MSS more KCl (-0,8 MPa); KCl, NaCl, manitol and saccharose in the osmotic potentials of -0,4, -0,2, -0,6 and -0,8 MPa. The used

statistical delineation was entirely casualized, with four repetitions (two plates more substratum with 25 seeds each/repetition). There were no significant differences between of the different employed methods and the blotter test deep freezing, considered the method standard for seed health testing of grassy, for detection of the *Fusarium graminearum* in wheat seeds.

Additional keywords: Giberela; detention methods; media half-selective; hidric restrictors.

Apesar de *Fusarium graminearum* estar amplamente disseminado nas regiões tritícolas, o plantio freqüente de sementes portadoras de *F. graminearum* pode aumentar a fonte de inóculo no campo, podendo até inviabilizar a cultura. A utilização de sementes livres do patógeno seria uma medida de controle visando diminuir a fonte de inóculo no campo.

Diferentes métodos podem ser empregados com a finalidade de avaliar as condições de sanidade de uma amostra de sementes visando a detecção de *F. graminearum*. O método da restrição hídrica, apesar de não ser o método utilizado com mais freqüência em laboratórios de rotina, tem sido empregado com sucesso na análise de sanidade de sementes de algumas espécies vegetais. Relativamente recente tal método evita a necessidade do congelamento, durante o período de

incubação das sementes e, em concentrações adequadas, não afeta o desenvolvimento de fungos associados às sementes e nem prejudica o cultivo dos mesmos com potenciais hídricos ajustados. (3,5). Diante do exposto o presente trabalho teve como objetivo comparar diferentes métodos utilizados em testes de sanidade para a detecção de *Fusarium graminearum* em sementes de trigo.

Para os estudos de comparação de métodos foram utilizadas sementes de trigo da cultivar BR 21, portadoras de *Fusarium graminearum*, cedidas pelo Centro Nacional de Pesquisas de Trigo (CNPT - EMBRAPA Trigo/Passo Fundo - R.S.). O delineamento empregado foi inteiramente casualizado, com vinte e dois tratamentos e quatro repetições de cinquenta sementes. Os tratamentos foram constituídos de: (i) papel de filtro modificado, com congelamento; (ii)

papel de filtro, (iii) papel de filtro modificado, com 2,4 - diclorofenoxiacetato de sódio (2,4 - D); (iv) papel de filtro com restritores hídricos (soluções de manitol, sacarose, cloreto de sódio e cloreto e potássio nas seguintes concentrações: -0,4, -0,6, -0,8 e -1,0 MPa); (v) meio semi-seletivo para *Fusarium graminearum*; (vi) meio semi-seletivo para *Fusarium graminearum* mais 2,4 - D (0,02% v/v); e (vii) meio semi-seletivo para *Fusarium graminearum*, mais cloreto de potássio (-0,8 MPa).

Cada unidade experimental foi constituída por duas placas de poliestireno, com nove cm de diâmetro, contendo 25 sementes de trigo distribuídas em: (i) meio de cultura (tratamento com meio semi-seletivo para *Fusarium graminearum*); (ii) três folhas de papel de filtro umedecidos com água destilada (tratamentos com e sem congelamento das sementes); (iii) três folhas de papel de filtro umedecidos com solução de 2,4 - D; (iv) papel de filtro umedecidos com restritores hídricos (manitol, sacarose, cloreto de sódio e cloreto de potássio).

As concentrações do restritores hídricos utilizados foram obtidas a partir do cálculo realizado pelo "software" SPMM<sup>â</sup> e os resultados estão descritos na Tabela 1. Com relação ao tratamento com meio semi-seletivo, utilizou-se o meio batata-dextrose-âgar (marca Merck KGaA<sup>â</sup>), com a adição, após a autoclavagem do meio e sob condições assépticas, de 8 g de âgar-âgar, 25 mg/L de iprodione, 15 mg/L de triadimenol, 25 mg/L de nistatina, 1000 mg/L de sulfato de estreptomicina e 50 mg/L de sulfato de neomicina, por litro de meio, de acordo com metodologia descrita por Segalin et al. (comunicação pessoal).

Após o período de incubação, a identificação de *F. graminearum* e de outros fungos presentes nas sementes foi feita baseando-se nas estruturas reprodutivas desses organismos visualizadas com o auxílio de microscópio estereoscópio e, quando necessário, com a preparação de lâminas para visualização em microscópio óptico. Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão para os restritores manitol, sacarose, KCl e NaCl, com o auxílio do "software" STAT<sup>â</sup>. Para os demais tratamentos foi realizada a análise de variância aplicando-se o teste de Tukey para a comparação dos resultados.

Os resultados obtidos nos estudos de comparação de métodos, expressos na Tabela 2, mostram que a maior incidência de *Fusarium graminearum* (37,5%) foi observada no método em que foi utilizado o meio semi-seletivo com 0,02% (v/v) de 2,4 - diclorofenoxiacetato de sódio (2,4 - D), enquanto que a menor incidência (12,5%) foi com a sacarose com potencial osmótico de -1,0 MPa. O método do meio semi-seletivo com 0,02% (v/v) de 2,4 - D diferiu significativamente dos seguintes tratamentos: manitol -0,6 MPa (15,0%); manitol -1,0 MPa (15,0%); sacarose -0,8 MPa (15,0%); papel de filtro (PF) (13,0%); e sacarose -1,0 MPa (12,5%). Os métodos em que foram empregados os sais cloreto de sódio (NaCl) e cloreto de potássio (KCl), para todos os potenciais osmóticos comparados, bem como os métodos em que foram utilizados manitol -0,4 MPa e -0,8 MPa e

sacarose -0,4 MPa e -0,6 MPa, além dos métodos do papel de filtro com congelamento das sementes ou com a adição de 2,4-D e os demais métodos com o uso de meio semi-seletivo não diferiram estatisticamente entre si.

Para detecção de *F. graminearum* o método do papel de filtro com restritores hídricos, quando se utilizou os solutos manitol, sacarose, NaCl e KCl, obteve-se resultados semelhantes aquele obtido com o método do papel de filtro com congelamento, recomendado para a detecção de fungos em gramíneas (2, 8, 9) e utilizado como padrão neste experimento. Este resultado é semelhante àqueles obtidos por Del Ponte et al. (6) que não verificaram influência dos níveis de restrição hídrica obtidos com os mesmos solutos na detecção de fungos em sementes de trigo, utilizando o mesmo método de incubação de sementes. Machado (10), utilizando os solutos manitol e NaCl, nos potenciais osmóticos de -0,4, -0,6, -0,8, -1,0 e -1,2 MPa, no teste de sanidade de sementes de algodoeiro com papel de filtro, também não encontrou efeito desses solutos na detecção de diferentes espécies de *Fusarium*. Contrastando esses resultados, Magalhães (11), avaliou o efeito da incubação de sementes de sorgo utilizando os restritores hídricos manitol e NaCl com os mesmos potenciais osmóticos utilizados no presente experimento e verificou que a incidência média de *Fusarium moniliforme* foi menor com a utilização desses solutos adicionados ao substrato quando comparado com a incidência média do mesmo fungo em sementes incubadas com o método do congelamento.

Foram detectados, além de *Fusarium graminearum*, os seguintes fungos: *Alternaria alternata*, *Epicoccum* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium semitectum*, *Bipolaris* sp. e *Bipolaris sorokiniana*. Com exceção de *Epicoccum* sp. e *Cladosporium* sp., os demais fungos não apresentaram diferenças significativas quanto a incidência nas sementes.

Em relação a eficiência dos métodos na inibição da germinação, os resultados apresentados na Tabela 2 mostram que o método do papel de filtro com congelamento diferiu dos demais métodos analisados, apresentando a menor porcentagem de sementes germinadas (1,5%), enquanto que o método do papel de filtro apresentou a maior porcentagem de sementes germinadas (91,0%), como era esperado. Embora os demais métodos tenham apresentado porcentagens expressivas de sementes germinadas, variando de 45,0% a 75,5%, vale ressaltar que foram constadas diferenças visuais quanto ao comprimento das estruturas seminais. Assim, os tratamentos com menores potenciais osmóticos (-0,4 MPa e -0,6 MPa), bem como o papel de filtro, apresentaram o maior número de sementes com desenvolvimento de estruturas seminais, possibilitando a movimentação das sementes nas placas. Por outro lado, tratamentos com maiores potenciais osmóticos (-0,8 MPa e -1,0 MPa), bem como o método do papel de filtro modificado com 0,02% (v/v) de 2,4 - D, propiciaram o menor desenvolvimento dessas estruturas, impedindo

Tabela 1 - Quantidades de manitol, sacarose, cloreto de potássio (KCl) e cloreto de sódio (NaCl) utilizadas para ajustar a solução em diferentes níveis de potencial osmótico (MPa)

Potencial osmótico ajustado (MPa)	Manitol	Sacarose g.L <sup>-1</sup>	KCl	NaCl
-0,4	29,3	46,4	6,6	5,1
-0,6	44,9	71,3	9,9	7,7
-0,8	59,8	95,1	13,4	10,3
-1,0	66,8	117,9	15,8	12,2

Tabela 2 - Incidência de fungos (%) e de sementes germinadas (%) encontradas em diferentes métodos de detecção utilizados no teste de sanidade de sementes de trigo de trigo.

Tratamento	F. graminearum	Epicoccum sp.	Cladosporium sp.	S.G.
MSS + 2,4 - D	37,5 A	21,5 AB	5,5 EF	56,0 B
PF + 2,4 - D	29,5 AB	29,5 AB	12,5 BCDEF	54,5 B
PF + congelamento	28,0 AB	12,5 B	12,5 BCDEF	1,5 C
PF + NaCl (-0,6 MPa)	27,5 AB	30,5 AB	10,5 BCDEF	62,5 AB
PF + NaCl (-0,8 MPa)	25,5 AB	26,0 AB	12,0 BCDEF	52,5 B
PF + Manitol (-0,8 MPa)	25,5 AB	30,0 AB	20,0 ABCDE	45,0 B
PF + NaCl (-0,4 MPa)	25,0 AB	20,5 AB	13,0 BCDEF	63,0 AB
PF + NaCl (-1,0 MPa)	24,0 AB	34,0 AB	15,0 BCDEF	47,5 B
PF + Manitol (-0,4 MPa)	23,0 AB	33,0 AB	24,0 ABC	65,5 AB
PF + Sacarose (-0,4 MPa)	23,0 AB	24,0 AB	25,0 AB	64,0 AB
MSS	23,0 AB	19,5 AB	2,0 F	75,5 AB
MSS + KCl (-0,8 Mpa)	23,0 AB	22,0 AB	7,0 DEF	60,0 B
PF + KCl (-1,0 MPa)	21,5 AB	31,0 AB	8,5 CDEF	57,0 B
PF + Sacarose (-0,6 MPa)	21,5 AB	21,0 AB	23,5 ABC	71,5 AB
PF + KCl (-0,6 MPa)	20,5 AB	32,5 AB	7,0 DEF	58,0 B
PF + KCl (-0,8 MPa)	20,5 AB	30,5 AB	7,5 DEF	57,0 B
PF + KCl (-0,4 MPa)	17,5 AB	23,0 AB	18,0 ABCDE	59,0 B
PF + Manitol (-0,6 MPa)	15,0 B	34,0 AB	20,5 ABCDE	63,0 AB
PF + Manitol (-1,0 MPa)	15,0 B	32,0 AB	22,5 ABCD	49,5 B
PF + Sacarose (-0,8 MPa)	15,0 B	37,0 A	25,0 AB	64,5 AB
PF	13,0 B	23,5 AB	10,0 BCDEF	91,0 A
PF + Sacarose (-1,0 MPa)	12,5 B	30,5 AB	32,5 A	56,5 B
F tratamentos	1,98*	1,96*	7,39**	7,52**
C.V. (%)	38,35	32,58	38,64	20,15

F: teste de F (análise de variância); C.V: coeficiente de variação; n.s.: não significativo; \*\* significativo com 99% de confiança; \* significativo com 95% de confiança; PF: papel de filtro; MSS: meio semi-seletivo; S.G.: sementes germinadas; valores acompanhados por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

a movimentação das sementes no interior das placas, bem como evitando que as mesmas tivessem as suas tampas levantadas.

A redução da germinação em sementes de diferentes espécies, como algodão (10), arroz e feijão (5), milho (7), soja (1) e trigo (6), foi observada quando se utilizaram potenciais osmóticos em torno de -1,0 MPa, obtidos com o uso de diversos solutos. Por outro lado, Celano (4) utilizou soluções de NaCl e manitol com diferentes potenciais osmóticos (0,0, -0,6, -1,2, -1,8 e -2,4 MPa) na incubação de sementes de trigo e observou que ambos os solutos, no potencial de -1,2 MPa, propiciaram porcentagens de germinação superiores a 90%, indicando semelhança com os resultados obtidos no presente trabalho, com o uso desses mesmos restritores.

O meio semi-seletivo utilizado neste trabalho está sendo desenvolvido na Universidade de Passo Fundo - RS e ainda não existem resultados publicados comprovando a sua eficiência na detecção de *Fusarium graminearum*. Contudo, o seu uso mostrou que ele é tão eficiente quanto o método padrão (papel de filtro com congelamento das sementes) recomendado pelas Regras de Análise de Sementes (2). O aumento dessa eficiência foi observado com a adição de 0,02% de 2,4-D ao meio, com o intuito de reduzir o desenvolvimento das estruturas seminais das sementes incubadas. Além disso, este método apresentou como principal vantagem a facilidade na identificação do patógeno, pois a análise foi feita baseando-se nas inspeções visuais das características morfológicas do fungo, o qual apresentou elevado

crescimento e abundante esporulação, reduzindo demasiadamente o uso de microscópio estereoscópio e óptico, otimizando assim, o tempo de análise das amostras.

Como mostra a Tabela 2 com exceção do manitol (-0,6 e -1,0 MPa) e da sacarose (-0,8 e -1,0 MPa), além do método de papel de filtro, os demais métodos analisados apresentaram resultados semelhantes ao método com a utilização do meio semi-seletivo com adição de 0,02% de 2,4-D e também ao método padrão, papel de filtro com o congelamento das sementes. Estes resultados indicam que tais métodos não influenciam a incidência de *F. graminearum* e, dessa forma, podem ser empregados no teste de sanidade de sementes de trigo.

A detecção de *F. graminearum* pode ser prejudicada pela alta incidência de fungos saprofitos (no caso *Epicoccum sp.* e *Cladosporium sp.*) detectada, de acordo com o método empregado, uma vez que a presença desses organismos competem com o patógeno pela superfície do substrato a ser colonizada, alimento e umidade do ar. Portanto, a escolha do método de detecção deve ser baseada em dois parâmetros: qual método proporciona a maior incidência do patógeno alvo e as menores incidências de organismos saprofitos. Seguindo essa premissa, o melhor resultado foi encontrado empregando o método do meio semi-seletivo com a adição de 2,4 - D com 0,02% (v/v).

De acordo com o que foi exposto anteriormente, conclui-se que existem diferenças significativas entre os diferentes métodos de detecção

avaliados. Solutos como manitol e sacarose podem favorecer a menor eficiência do método na detecção de *Fusarium graminearum*. Por outro lado, esse patógeno pode ser eficientemente detectado em sementes pelos métodos do meio semi-seletivo com ou sem adição de 2,4 - D, papel de filtro mais 2,4-D e papel de filtro com os restritores hídricos (manitol, sacarose, cloreto de sódio e cloreto de potássio) em todos os potenciais osmóticos, exceto aqueles anteriormente citados para manitol e sacarose.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alves, C. A.; Gravena, J. C.; Moraes, M. H. D.; Athayde Sobrinho, C.; Dezordi, C.; Menten, J. O. M. Restrição hídrica como alternativa ao congelamento no método do papel de filtro para detecção de patógenos em sementes de soja. In: Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes, 7., 2002, Sete Lagoas. Anais. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2002. p.89.
2. Brasil. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, Regras para análise de sementes. Brasília: 1992. 365p.
3. Carvalho, J. C. B. Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). 1999. 98p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
4. Celano, M. M. Uso da restrição hídrica em teste de sanidade e em estudos sobre a interação entre fungos e sementes de trigo. 2003. 91p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
5. Coutinho, W. C. Uso da restrição hídrica no controle da germinação de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em testes de sanidade. 2000. 78p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
6. Del Ponte, E. M. Restrição hídrica em testes de sanidade com sementes de trigo. Congresso Brasileiro de Sementes, 12., 2001, Curitiba. Anais. Londrina: ABRATES, 2001, p. 167.
7. Gravena, J. C.; Alves, C. A.; Moraes, M. H. D.; Dezordi, C.; Athayde Sobrinho, C.; Menten, J. O. M. Utilização de restrição hídrica no método do papel de filtro para detecção de patógenos em sementes de milho. In: Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes, 7., 2002, Sete Lagoas. Anais. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2002. p. 99.
8. International Seed Testing Association - International rules for seed testing. Proceedings International Seed Testing Association, Zürich, v.31, p.1-52, 1966..
9. Limonard, T. Ecological aspects of seed health testing. Proceedings of International Seed Testing Association, Zürich, v.33, n.3, pp.343-513, 1968.
10. Machado, A. Q. Uso da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes de algodoeiro. 2002. 55p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
11. Magalhães, F. H. L. Restrição hídrica em patologia de sementes: novas aplicações. 2005. 131p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.