

CRESCIMENTO RADIAL DE *Bipolaris sorokiniana* EM RESPOSTA A INDUÇÃO DE RESTRIÇÃO HÍDRICA POR SOLUTOS OSMÓTICOS EM MEIO AGARIZADO

RADIAL GROWTH OF *Bipolaris sorokiniana* IN RESPONSE TO WATER RESTRICTION INDUCED BY OSMOTIC SOLUTES IN AGAR MEDIA

FARIAS, Cândida R. J. de¹; DEL PONTE, Emerson M.²; CORREA, Carla L.³; PIEROBOM, Carlos R.⁴

RESUMO

O presente trabalho teve o objetivo de avaliar o crescimento radial de micélio do fungo *Bipolaris sorokiniana* em meio de cultura modificado com solutos osmóticos para se obter potencial hídrico negativo. O meio BDA foi modificado pela adição de sacarose, KCl e NaCl, em concentração ajustada para a obtenção dos níveis de restrição hídrica -0,4; -0,6 e -0,8 MPa. O crescimento do fungo ocorreu sob condições controladas de temperatura (25 °C) e fotoperíodo alternado de 12 horas. A avaliação do diâmetro médio de colônias foi efetuada no sétimo dia da inoculação. Os resultados mostraram que um estímulo ao crescimento do fungo foi obtido com a adição de KCl e sacarose, nos níveis testados. Por outro lado não se verificou efeito positivo com a adição de NaCl no crescimento das colônias, comparado com a testemunha.

Palavras-chave: *Bipolaris*, potencia osmótico, crescimento, meio de cultura.

INTRODUÇÃO

Na área de patologia de sementes, tem sido crescente o interesse pela utilização da técnica da restrição hídrica, seja em meio de cultura agarizado ou substrato de papel, com o objetivo de inibir ou retardar a germinação das sementes, facilitando as operações de avaliações de flora fúngica em testes de sanidade (COUTINHO et al., 2001; FARIAS et al., 2003; MACHADO et al., 2004). Baseado no princípio de controle da germinação, a metodologia também tem sido empregada na promoção da infecção de sementes com fungos fitopatogênicos, visando a estudos epidemiológicos (MACHADO et al., 2001; DEZORDI, 2002).

O estresse hídrico induzido em diferentes tipos de substratos é um fator que tem influenciado o comportamento de crescimento dos fungos (COOK & PAPENDICK, 1972; GAO & SHAIN, 1995). Segundo COOK & PAPENDICK (1978) o estresse hídrico é um fator condicionante do processo de penetração do inóculo em tecidos vegetais suscetíveis, sugerindo que o conhecimento das exigências hídricas dos fungos pode fornecer subsídios para as medidas de controle de doenças.

O potencial hídrico é a diferença entre o potencial químico da água em um sistema, ou parte do sistema, e o potencial químico da água livre, em condições iguais da

pressão atmosférica e temperatura (DUNIWAY, 1979). Este potencial é reduzido pela adição de substâncias polares e, ou, íons ao meio, já que as moléculas bipolares da água são atraídas e retidas por estes solutos, induzindo um decréscimo na atividade da água (FERREIRA, 1988). Neste sentido, a indução da restrição hídrica é normalmente feita através da adição de solutos osmoticamente ativos como CaCl₂, KCl, NaCl, manitol, sacarose ou de polietileno glicol.

Alguns estudos evidenciaram que os fungos apresentam comportamento alterado em relação ao estresse hídrico induzido em diferentes substratos de cultivo, tal como foi observado em *Botrytis cinerea* e *Alternaria alternata* (ALAM et al., 1996); *Phytophthora cinnamomi* e *Alternaria tenuis* (ADEBAYO & HARRIS, 1971); *Fusarium roseum* (WEARING & BURGESS, 1979); *Fusarium moniliforme* (SUBBARAO et al., 1993); *Cryphonectria parasitica* (GAO & SHAIN, 1995); *Armillaria gallica* e *Armillaria mellea* (WHITING & RIZZO, 1999).

De maneira geral, observa-se que o crescimento do fungo é estimulado até um nível ótimo, declinando sob potenciais hídricos muito negativos, normalmente acima de -1,0 MPa. *Ascochyta paspali* teve seu crescimento reduzido a partir do potencial osmótico de -1,2 MPa, sendo inibido a -4,5 MPa (MORLEY et al., 1993). Em *Colletotrichum lindemuthianum* foi observado um crescimento das colônias em BDA modificado osmoticamente com manitol, superior a testemunha, até o nível de restrição hídrica de -0,61 MPa, tendendo a declínio em potenciais hídricos mais negativos, até a restrição de -1 MPa. No mesmo estudo, utilizando-se o meio BDA modificado com polietileno glicol (PEG 6000), o diâmetro das colônias decresceu à medida que o potencial hídrico do substrato se tornou mais negativo (CARVALHO et al., 2001). O uso do polietileno glicol (PEG 6000) induziu a restrição hídrica no substrato, afetando negativamente o crescimento de *C. lindemuthianum* (CARVALHO et al., 2001) possivelmente originando potenciais mais negativos, na presença de outros solutos, conforme relatado por MICHEL (1983). Uma hipótese acerca do efeito estimulador no crescimento fúngico, até determinado potencial hídrico negativo, está associada à absorção de solutos e do melhor ajuste osmótico das células fúngicas, proporcionando maior turgor para a extensão celular (ALAM et al., 1996).

¹ Eng. Agr., Doutoranda, Bolsista CAPES, Programa de Pós-graduação em Fitossanidade, Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/, C.P. 354, CEP. 96010-900, Pelotas, RS. Email: candidajacobsen@bol.com.br

² Eng. Agr., Doutorando, Bolsista CNPq, Programa de Pós-graduação em Fitossanidade, Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/, C.P. 354, CEP. 96010-900, Pelotas, RS. Email: edelponte.faem@ufpel.edu.br

³ Estudante de Graduação em Agronomia, Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/, C.P. 354, CEP. 96010-900, Pelotas, RS.

⁴ Eng. Agr., PhD, Prof. Titular do Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/, C.P. 354, CEP. 96010-900, Pelotas, RS. Email: pierobom@ufpel.edu.br

(Recebido para publicação em 05/01/2004, Aprovado em 19/07/2004)

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho objetivou avaliar a influência da restrição hídrica do substrato agarizado no crescimento micelial do fungo *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker, um importante patógeno da cultura do trigo, agente causal da mancha marrom ou helmintosporiose.

Os estudos foram realizados no Laboratório de Patologia de Sementes da Universidade Federal de Pelotas-RS, no período de outubro a dezembro de 2002. As culturas puras iniciais de *B. sorokiniana* foram obtidas na micoteca do laboratório. A multiplicação do inóculo foi realizada, inicialmente, por meio de repicagem de fragmentos de micélio, em cultivo em tubos de ensaio, para placas de Petri de vidro, de 9 cm de diâmetro, contendo meio BDA básico. A partir de colônias desenvolvidas, após sete dias em câmara de crescimento, à temperatura de 25°C e fotoperíodo alternado de 12 horas, foi efetuada a repicagem definitiva do inóculo para o meio BDA básico modificado osmoticamente, conforme os tratamentos.

Os tratamentos de restrição hídrica foram obtidos com a adição de uma solução concentrada de solutos (sacarose, KCl e NaCl), em quantidades calculadas a fim de ajustar o meio BDA a diferentes potenciais osmóticos (0,0; - 0,4; - 0,6 e - 0,8 MPa). A concentração dos solutos foi calculada com o software SPM, utilizando no cálculo a temperatura de 25°C (MICHEL & RADCLIFFE, 1995). O valor calculado da quantidade de soluto pelo software foi preparado em dobro na solução osmótica. Um volume da solução osmótica foi adicionado ao mesmo volume de meio de cultura básico fundente (BDA), para a obtenção dos níveis de restrição final no BDA previamente calculados. Como testemunha (o nível zero), utilizou-se uma solução de água destilada, ao invés da solução osmoticamente modificada, na preparação do meio.

Após o preparo dos meios modificados, estes foram distribuídos, sob condições assépticas, em placas de Petri

(9 cm de diâmetro) em um volume de 20 mL de meio por placa. No centro da placa foi inoculado um disco de micélio (5 mm de diâmetro) de *B. sorokiniana* oriundos do meio BDA básico, conforme anteriormente descrito. As placas foram incubadas em câmara de crescimento com temperatura ao redor de 25°C e fotoperíodo alternado de 12 horas.

A medição das colônias, levando-se em consideração a média de dois diâmetros ortogonais das colônias em desenvolvimento, foi efetuada no sétimo dia após a incubação das colônias. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com os tratamentos em arranjo fatorial com um fator qualitativo (3 solutos osmóticos) e um fator quantitativo (4 níveis de restrição hídrica). Cada tratamento foi constituído de 4 a 6 repetições (placas). Os dados foram submetidos à análise de variação, utilizando-se o PROC GLM do pacote estatístico SAS (SAS, CARY, INC).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise de variação, o diâmetro médio das colônias de *Bipolaris sorokiniana* foi influenciado significativamente ($P < 0,001$) pelo tipo de soluto osmótico e pelo nível de restrição hídrica ($P < 0,001$), no entanto não foi significativa a interação entre ambos ($P = 0,06$). Como pode ser observada na Figura 1, a adição de NaCl, produzindo níveis negativos de potencial hídrico, não promoveu um maior estímulo ao crescimento do fungo em comparação a testemunha, enquanto que a adição de maior quantidade de sacarose e KCl estimulou o maior crescimento das colônias até os níveis testados, exceto para a sacarose, onde o pico de crescimento da colônia, ocorreu no nível de restrição de - 0,6 MPa, com queda no nível - 0,8 MPa. Todos os solutos, nos níveis testados, não apresentaram efeito inibitório ao crescimento do fungo, comparado ao crescimento no meio BDA básico.

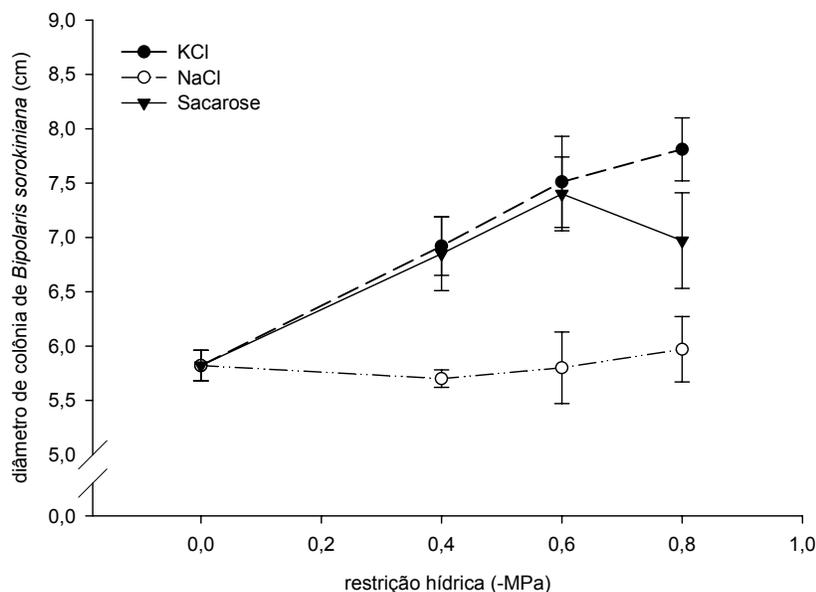


Figura 1 – Diâmetro médio de colônias de *Bipolaris sorokiniana* aos 7 dias de idade, sob a influência de diferentes níveis de restrição hídrica no meio BDA, com a adição de soluções de KCl, NaCl e sacarose. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Os resultados obtidos concordam com outros trabalhos que evidenciaram o efeito positivo da alteração potencial hídrico, no crescimento micelial de fungos, associado ao tipo de soluto osmótico utilizado, principalmente aqueles que servem como fonte adicional de carbono. Em *Ascochyta paspali* (MORLEY et al., 1993) e *Alternaria alternata* e *Botrytis cinerea* (ALAM et al. 1996), o uso da sacarose para alterar o potencial hídrico do substrato proporcionou um aumento no diâmetro médio das colônias dos fungos. No entanto, para *A. paspali* o crescimento micelial foi reduzido a partir do potencial osmótico de - 1,2 MPa, sendo inibido a - 4,5 MPa. De acordo com GAO & SHAIN (1995), o estímulo ao crescimento fúngico seria proporcionado pela fonte adicional de carbono fornecido por açúcares, tal como os autores verificaram em um trabalho com o fungo *Cryphonectria parasitica*. A partir de potenciais osmóticos muito negativos (< - 2,0 MPa) pode ocorrer o efeito negativo direto da restrição hídrica no crescimento dos fungos, sendo a faixa de inibição variável entre as espécies de fungos (ALAM et al., 1996).

No presente estudo, foi observado que a utilização de sacarose para modificar o potencial osmótico do meio BDA estimulou o crescimento de *B. sorokiniana* com pico de diâmetro médio de colônia no nível de - 0,6 MPa. Estes resultados traçam um paralelo com aqueles obtidos por DEZORDI (2002) observando o crescimento micelial de *Bipolaris oryzae*, sob a influência de níveis de restrição hídrica induzidos por manitol e sacarose em meio BDA. O autor verificou um aumento crescente no diâmetro de colônia para o restritor manitol, até o potencial de - 0,8 MPa, seguido de declínio no potencial - 1,0 MPa, enquanto que para a sacarose, o aumento ocorreu até o potencial de - 0,6 MPa, com declínio acima deste valor. Já para os meios modificados osmoticamente com NaCl e KCl, houve aumento do crescimento no potencial de - 0,7 MPa, com declínio em potenciais mais negativos, em desacordo com o presente trabalho, em relação ao uso do NaCl, onde não se verificou aumento no diâmetro da colônia.

Da mesma forma, CARVALHO et al. (2001) observaram que colônias de *Colletotrichum lindemuthianum* apresentaram um maior diâmetro médio em meio BDA modificado osmoticamente com manitol, superior a testemunha, até o nível de restrição hídrica de - 0,61 MPa, tendendo a declínio em potenciais hídricos mais negativos, até o nível de - 1,0 MPa, embora ainda superior a testemunha. Os autores discutem que a fonte de carbono adicional, fornecida pelo manitol, pode ter contribuído para o maior crescimento das colônias de *C. lindemuthianum*, confirmando os estudos de MATHUR (1950) que verificou a fácil metabolização do manitol pelo referido fungo. Como no presente trabalho não foram testados níveis mais negativos do que - 0,8 MPa, é possível que ocorra uma diminuição no crescimento da colônia em níveis mais negativos, até a inibição do crescimento, conforme evidenciado em outros estudos (GAO & SHAIN, 1995; ADEBAYO & HARRIS, 1971; MORLEY et al, 1993). O maior estímulo ao crescimento fúngico obtido com a adição de KCl pode estar relacionado à hipótese de DUNIWAY (1979) que sugeriu que a permeabilidade seletiva da membrana, associado à compatibilidade ou toxidez de solutos adicionados no substrato, pode influenciar o crescimento diferenciado de fungos a diferentes solutos osmóticos. Em um estudo com *Geotrichum candidum*, foi verificado um pronunciado decréscimo no diâmetro de colônias de 48 horas de idade, entre potenciais osmóticos de - 15 a - 2,5 MPa. No entanto, foi observado um incremento no crescimento sob potenciais de -

0,5 a -1,0 MPa, com diferenças mínimas entre os osmoreguladores KCl, polietileno glicol e manitol (BAUDOIN & DAVIS, 1987).

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a técnica de restrição hídrica visando ao controle da germinação de sementes, em testes de sanidade para detecção de *Bipolaris sorokiniana*, em níveis de até - 0,8 MPa, não afeta negativamente o crescimento deste fungo, ao contrário, pode estimular o seu crescimento, quando se utiliza a sacarose ou KCl para ajuste do potencial osmótico do substrato, seja o papel filtro ou meio agarizado. Em trabalhos anteriores foi observado que a restrição hídrica, em níveis de - 0,6 a - 0,8 MPa, não afetou os resultados da detecção de diversos fungos associados às sementes de culturas como soja, arroz, trigo e milho (COUTINHO et al., 2001; MACHADO et al., 2004; FARIAS et al., 2003).

CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos, verifica-se que a técnica de restrição hídrica pode ser utilizada como uma eficiente ferramenta para estimular o crescimento do fungo *B. Sorokiniana*.

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the radial growth of Bipolaris sorokiniana on PDA media modified by addition of osmotic solutes. PDA was amended with sucrose, KCl and NaCl, in different concentrations adjusted to achieve osmotic potentials of - 0,4; - 0,6 and - 0,8 MPa. Fungus growth occurred under controlled temperature (25°C) and alternated photoperiod (12 hours). Evaluations on mean diameter of colonies were carried out at seven days post inoculation. Results showed that the fungus growth was stimulated by addition of KCl and sucrose, compared to control. Nevertheless, no positive effect on mycelium growth was observed with the use of NaCl.

Key words: Bipolaris, osmotic potential, growth, culture media.

REFERÊNCIAS

- ADEBAYO, A.A.; HARRIS, R.F. Fungal growth responses to osmotic as compared to matric water potential. **Soil Science America Proceedings**, v.35, n. 3, p. 465-469, 1971.
- ALAM, S.; JOYCE, D.; WEARING, A. Effects of equilibrium relative humidity on in vitro growth of *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, East Melbourne, v.36, n.3., p.383-388, 1996.
- BAUDOIN, A.B.A.M.; DAVIS, L.L. Effect of osmotic and matric potential on radial growth of *Geotrichum candidum*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 88, n.3, p. 323-328, 1987.
- CARVALHO, J.C.B.; MACHADO, J.C.; VIEIRA, M.G.G.C. Crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum* em relação à restrição hídrica do substrato agarizado. **Ciência Agrotecnológica**, v. 25, n. 4, p. 999-1005, 2001.
- COOK, R.J.; PAPENDICK, R.I. Influence of water potential of soils and 3555 plants on disease. **Annual Review of Phytopathology**, v.10, n.1, p. 349-374, 1972.
- COOK, R.J.; PAPENDICK, R.I. Role of potential in microbial growth and development of disease, with special reference to

- postharvest pathology. **HortScience**, v.13, n. 5, p. 559-564,1978.
- COUTINHO, W.M.; MACHADO, J.C.; VIEIRA, M.G.G.C. 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**, v. 23, n. 2, p. 127-135, 2001.
- DEZORDI, C. **Inoculação de fungos em sementes de arroz sob restrição hídrica**. Pelotas, Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel" – Universidade Federal de Pelotas. 2002. 46p. (Dissertação de mestrado).
- DUNIWAY, J.M. Water relations of water molds. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.17, n.1, p. 431-460, 1979.
- FARIAS, C.R.J.; DELPONTE, E.M.; DALMAGRO, T. et al. Inibição de germinação de sementes de trigo e milho em teste de sanidade em substrato papel. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n.2, p. 141-144, 2003.
- FERREIRA, L.G.R. **Fisiologia vegetal: relações hídricas**. Fortaleza, Edições Universidade Federal do Ceará, 1988. 137p.
- GAO, S.; SHAIN, L. Effect of potential on virulent and hypovirulent strains of the chestnut blight fungus. **Canadian Journal of Forest Research**. Ottawa, v.25, n.6, p. 1024-1029, 1995.
- MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C. et al. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n.2, p. 88-94, 2001.
- MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C. et al. Controle da germinação de sementes de soja em testes de sanidade pelo uso da restrição hídrica. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n.2, p. 77-81, 2004.
- MATHUR, R.S.; BARNETT, H.L.; LILLY, V.G. Sporulation of *Colletotrichum lindemuthianum* in culture. **Phytopathology**, v. 40, n. 1, p.104-114, 1950.
- MICHEL, B.E. Evaluation of the water potential of solutions of polyethylene glycol 8000 both in the absence and presence of other solutes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 72, n. 1, p. 66-70,1983.
- MICHEL, B.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, p. 126-130, 1995.
- MORLEY, T. B.; WILLIAMS, B. L.; PRICE, T. V. The effects of water stress on the incidence and severity of paspalum leaf blight and on *Ascochyta paspali*. **Australasian Plant Pathology**, v. 22, n. 3, p.105-110, 1993.
- SUBBARAO, K.V.; MICHAELIDES, T.J.; MORGAN, D.P. Effects of osmotic potential and temperature on growth of two pathogens of figs and a biocontrol agent. **Phytopathology**, v. 83, n. 12, p. 1454-1459, 1993.
- WEARING, A.H.; BURGESS, L. W. Water potential and the saprophytic growth of *Fusarium roseum* "graminearum". **Soil Biology Biochemistry**, v. 11, p. 661-667, 1979.
- WHITING, E.C.; RIZZO, D.M. Effect of water potential on radial colony growth of *Armillaria mellea* and *A. gallica* isolates in culture. **Mycologia**, v. 91, n.4, p. 627-635, 1999.