

INOCULAÇÃO DE SEMENTES DE FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris*) COM *Colletotrichum lindemuthianum* USANDO DIFERENTES NÍVEIS DE RESTRIÇÃO HÍDRICA

INOCULATION OF SEEDS OF COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris*) WITH *Colletotrichum lindemuthianum* USING DIFFERENT LEVELS OF HIDRIC RESTRICTION

Rey, Maristela dos Santos¹; Lima, Nelson Bernardi²; Santos, Juliano dos³; Pierobom, Carlos Roberto⁴; Balardin, Ricardo Silveiro⁵.

RESUMO

Este trabalho teve o objetivo de usar a restrição hídrica na inoculação das raças 2, 23 (delta) e 2047 de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*). O meio de cultura Mathur, foi modificado osmoticamente com os solutos sacarose e NaCl, nos potenciais osmóticos - 0,6, -0,8 e -1,0 Mpa nos tempos de 96 e 168 horas. Após o crescimento do fungo sobre o meio Mathur modificado osmoticamente, as sementes foram semeadas, de modo que ficassem em contato com a colônia. A quantidade de soluto utilizada para atingir os níveis de restrição hídrica foi calculada pelo "software SPMM –

Solute potential and molar-molar-g water conversion". Após as inoculações, as sementes foram avaliadas pelo método do Rolo de Papel.

Concluiu-se, que a sacarose e o tempo de 96 horas de inoculação nos potenciais osmóticos de -0,8 e -1,0 Mpa favorecem a inoculação de *C. lindemuthianum*, pois foram obtidas maiores porcentagens de sementes de feijoeiro infectadas pelo fungo, com exceção da raça 2 que mostrou valores superiores com NaCl.

Palavras-chave: antracnose, restrição hídrica, feijoeiro

ABSTRACT

This experiment had the goal to use the hydro restriction method on the inoculation of *C. lindemuthianum* 2, 23 (delta) and 2047 races in common bean seeds (*Phaseolus vulgaris*). The Mathur culture media was modified with sucrose and NaCl, in the osmotic potentials of -0,6, -0,8 e -1,0 Mpa at 96 and 168 hours. After fungus growth on Mathur's media the seeds were planted as reached the fungus colony border. The amount of solute used to reach the hydro restriction levels, was calculated by the "software SPMM - Solute potential and molar-molar-g water conversion". After inoculation, the seeds were evaluated by Paper roll method. The sucrose and 96 hours of inoculation at -0,8 e -1,0 Mpa osmotic potentials favored the *C. lindemuthianum* inoculation, were obtained high tax seeds of infected bean with the pathogen, and the race 2 showed values must with NaCl.

Key words: anthracnose, hydro restriction, common bean.

A restrição hídrica baseia-se em modificar o potencial osmótico de meios de cultura ou substratos utilizando solutos osmóticos. A técnica

atualmente vem sendo testada como método de evitar a germinação de sementes em testes de sanidade sem afetar a detecção de fungos. O potencial osmótico representa a influência de solutos ou substâncias que são adicionadas à água, e é inversamente proporcional à concentração de solutos que são adicionados à solução, assumindo valores negativos ou iguais a zero para a água pura (SALISBURY & ROSS, 1992).

O estudo do comportamento de organismos fitopatogênicos em substrato agarizado, modificado osmoticamente também tem sido de grande interesse, tanto em métodos de inoculação de fungos em sementes (CARVALHO, 1999), como em testes de sanidade (COUTINHO, 2000).

A restrição também pode modificar o desenvolvimento normal de patógenos em seus hospedeiros (COOK & PAPENDICK, 1978). Alguns autores citam que o comportamento positivo dos fungos com relação ao estresse hídrico pode ser atribuído à absorção de solutos osmóticos que favoreçam seu crescimento micelial e ao melhor ajuste osmótico da célula fúngica aos quais proporcionam maior turgidez da célula; e o comportamento negativo, aos efeitos diretos da restrição hídrica induzida pelos solutos (COUTINHO, 2000). Portanto, o estudo do desenvolvimento de fungos fitopatogênicos em relação às suas exigências hídricas, pode favorecer o desenvolvimento de tecnologias que possam favorecer o controle de doenças relacionadas com esses patógenos (CARVALHO et al., 2001). De acordo com CARVALHO (1999), o uso da técnica de restrição hídrica em meio BDA com manitol a -0,8 Mpa de restrição foram eficazes para inocular *C. lindemuthianum* em sementes de feijoeiro, já que o tempo de exposição das sementes ao fungo foi aumentado, sem que ocorresse germinação das mesmas.

De acordo com PEREZ et al. (2002) a inoculação de soja com *Sclerotinia sclerotiorum* em meio BDA por 30 horas de exposição das sementes ao fungo mostrou uma incidência de 100%, porém, não ocorreu infecção interna das sementes, ocorrendo contaminação quando estas foram postas em contato com o patógeno.

Este trabalho teve o objetivo de avaliar a restrição hídrica como metodologia de inoculação de sementes de feijoeiro comum com as raças de 2, 23 e 2047 de *C. lindemuthianum*.

O experimento foi conduzido no ano de 2003-2004 no laboratório de Patologia de Sementes, no Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas. Foram utilizadas uma mistura de sementes do cultivar Ft Nobre pertencente ao grupo preto, homogenizadas em um divisor cônico (Boerner). Foram usados dois lotes provenientes do Rio Grande do Sul e Santa Catarina produzidos nas safras 2001-2002.

1 Eng. Agr^a.Msc., Doutoranda, Bolsista CAPES, Programa de Pós-graduação em Fitossanidade. Departamento de Fitossanidade, FAEM/UFPeL. Campus universitário s/n, caixa postal 354, CEP 96010-900, Pelotas/RS. E-mail: maris_rey@yahoo.com.br (autor para correspondência),

2 Bolsista Lab. Patologia de sementes, Departamento de Fitossanidade, FAEM/UFPeL. Campus Universitário s/n, caixa postal 354, CEP 96010-900, Pelotas/RS.

3 Biólogo, Bolsista CAPES, Programa de Pós-graduação em Fitossanidade. Departamento de Fitossanidade, FAEM/UFPeL. Campus universitário s/n, caixa postal 354, CEP 96010-900, Pelotas/RS

4 Eng. Agr. PhD. Professor Titular Departamento de Fitossanidade, FAEM/UFPeL. Campus universitário s/n, caixa postal 354, CEP 96010-900, Pelotas/RS.

5 Eng. Agr. PhD. Professor Adjunto do Departamento de Defesa Fitossanitária, CCR/ UFSM. CEP 97105-900- Santa Maria – RS.

(Recebido para Publicação em 12/03/2008, Aprovado em 29/07/2008)

Após teste inicial de germinação, obteve-se 100% de germinação de sementes. Foram utilizadas as raças 2047, 23(delta) e 2, oriundas da Micoteca do Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria, identificadas por um SISTEMA BINÁRIO e pelas plantas diferenciadoras propostas pelo CIAT (PASTOR-CORRALES, 1992). A avaliação da qualidade sanitária das sementes foi realizada pelos métodos do papel filtro e rolo de papel, descrito como método de detecção para o fungo *C. lindemuthianum* para sementes de feijão, conforme as Regras de Análises de Sementes (BRASIL, 1992). Da mistura dos lotes, 400 sementes foram distribuídas em 16 repetições de 25. A incubação foi de sete dias com temperatura de $25^{\circ} \pm 2^{\circ}C$ e fotoperíodo de 12 horas. Para a detecção do fungo *C. lindemuthianum* foi usado o teste do rolo de papel. Os rolos foram acondicionados por 12 dias com temperatura de $20^{\circ} \pm 2^{\circ}C$ e fotoperíodo de 12 horas, e a germinação das sementes de feijão foi

verificada pelo mesmo método, sendo a porcentagem de germinação calculada sobre o número de sementes usadas para o teste.

O cálculo em gramas/litro da quantidade dos solutos utilizados foi feito através do software SPMM (MICHEL & RADCLIFFE, 1995), usando uma temperatura base de $21^{\circ}C$. Os potenciais osmóticos utilizados foram -0,6; -0,8 e -1,0 Mpa, induzidos pelos solutos sacarose e NaCl, conforme Tabela 1. O meio utilizado como substrato para o fungo e sementes foi meio Mathur (TUIE, 1969). Uma solução de esporos contendo 0,2 mL foi depositada sobre 10 mL de meio de cultura, espalhando a solução com uma alça de Drigalski e incubando sob temperatura de $20^{\circ}C$ e fotoperíodo de 12 horas de luz por 5 dias. Antes da deposição das sementes sobre o fungo foi feita uma assepsia superficial, onde as sementes eram mergulhadas em uma solução de hipoclorito 1% por 1 minuto e depois lavadas com água estéril por três vezes consecutivas.

Tabela 1- Dose em gramas dos solutos utilizados em 150 mL de água. Pelotas, 2005.

Soluto	Potencial Osmótico (Mpa)	Soluto em gramas
Sacarose	-0,6	9,78
	-0,8	13,59
	-1,0	16,85
NaCl	-0,6	0,95
	-0,8	1,33
	-1,0	1,72

Após o crescimento da colônia do fungo, 25 sementes foram semeadas na placa de Petri sobre a colônia, de modo que ficassem em contato com o fungo, onde foram testados dois tempos de infecção (96 e 168 h). Logo após, as sementes foram secas por 72 horas em temperatura de $25^{\circ}C$, para que fosse retirada a umidade. As sementes germinadas foram eliminadas, uma vez que o objetivo era a obtenção de sementes inoculadas e viáveis. Para a análise dos dados foi usado o teste de médias de Scott-Knott, gerado no programa estatístico SASM- AGRI versão 8.2.

Os resultados referentes aos testes de inoculação e porcentagem

de sementes germinadas utilizando NaCl e sacarose nos potenciais osmóticos -0,6,-0,8 e -1,0 Mpa para as três raças de *C. lindemuthianum* encontram-se nas Tabelas 2, 3, 4, 5, 6 e 7. O melhor resultado foi quando obteve-se baixa germinação e significativa infecção das sementes. Observou-se nítida vantagem do período de 96 horas de incubação, no número de sementes infectadas e não germinadas. No período de 168 horas um maior número de sementes foi descartado por germinarem (muitas das quais infectadas), a qual não se enquadra no objetivo deste trabalho, que é a obtenção de sementes infectadas e viáveis.

Tabela 2 Porcentagem de infecção de sementes de feijão pela raça 23 de *Colletotrichum lindemuthianum*, em dois tempos de incubação sob três potenciais osmóticos e dois solutos (NaCl e sacarose). Pelotas, 2005.

Potencial Osmótico	NaCl			Sacarose			Testemunha
	-0,6	-0,8	-1,0	-0,6	-0,8	-1,0	
Tempo de incubação							
96 horas	0,00 f*	12,6 c	8,8 d	78,0 a	6,0 e	60,5 b	0,0 f
168 horas	0,0 d	0,0,d	36,0 a	0,0 d	26,0 b	20,0 c	0,0 d

* Médias seguidas de mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott à nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 3 - Porcentagem de sementes germinadas durante o período de 96 e 168 horas de incubação com a raça 23 de *Colletotrichum lindemuthianum* sob dois solutos (NaCl e sacarose) e três potenciais osmóticos. Pelotas, 2005.

Potencial Osmótico	NaCl			Sacarose			Testemunha
	-0,6	-0,8	-1,0	-0,6	-0,8	-1,0	
Tempo de incubação							
96 horas	84,2f*	9,6b	29,7d	57,6e	16,3c	0,6a	100g
168 horas	2,35a	10,37c	2,84b	14,82d	36,82e	70,35f	100g

* Médias seguidas de mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott à nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 4 - Porcentagem de infecção de sementes de feijão pela raça 2 de *Colletotrichum lindemuthianum*, em dois tempos de incubação sob três potenciais osmóticos e dois solutos (NaCl e sacarose). Pelotas, 2005.

Potencial Osmótico	NaCl			Sacarose			Testemunha
	-0,6	-0,8	-1,0	-0,6	-0,8	-1,0	
Tempo de incubação							
96 horas	8,0 d*	22,6 b	57,0 a	2,0 e	20,6 c	22,7 b	0,0 f
168 horas	0,0 e	0,0 e	29,3 d	37,7 c	46,0 b	47,7 a	0,0 e

* Médias seguidas de mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott à nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 5 - Porcentagem de sementes germinadas durante o período de 96 e 168 horas de incubação com a raça 2 de *Colletotrichum lindemuthianum* sob dois solutos (NaCl e sacarose) e três potenciais osmóticos. Pelotas, 2005.

Potencial Osmótico	NaCl			Sacarose			Testemunha
	-0,6	-0,8	-1,0	-0,6	-0,8	-1,0	
Tempo de incubação							
96 horas	75,7 f	60,7 e	26,2 c	28,2 d	22,2 e	8,8 a	100,0 g
168 horas	98,4 f	93,4 e	38,3 a	64,1 d	47,8 e	52,1 c	100,0 g

* Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si no teste de Scott Knott à nível de 5 % de probabilidade de erro.

Tabela 6 - Porcentagem de infecção de sementes de feijão pela raça 2047 de *Colletotrichum lindemuthianum*, em dois tempos de incubação sob três potenciais osmóticos e dois solutos (NaCl e sacarose). Pelotas, 2005.

Potencial Osmótico	NaCl			Sacarose			Testemunha
	-0,6	-0,8	-1,0	-0,6	-0,8	-1,0	
Tempo de incubação							
96 horas	26,6 c	9,3 d	1,3 f	7,3 e	80,0 a	50,0 b	0,0 f
168 horas	0,0 e	0,0 e	24,0 d	30,7 c	60,0 a	41,1 b	0,0 e

* Médias seguidas de mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott à nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 7 - Porcentagem de sementes germinadas durante o período de 96 e 168 horas de incubação com a raça 2047 de *Colletotrichum lindemuthianum* sob dois solutos (NaCl e sacarose) e três potenciais osmóticos. Pelotas, 2005.

Potencial Osmótico	NaCl			Sacarose			Testemunha
	-0,6	-0,8	-1,0	-0,6	-0,8	-1,0	0,0
Tempo de incubação							
96 horas	27,3 c*	21,0 a	20,2 a	50,3 f	36,7 e	28,1 d	100g
168 horas	85,1 e	85,3 e	4,7 a	66,0 d	64,0 c	53,0 b	100f

** Unidades em Mpa * Médias seguidas de mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott à nível de 5% de probabilidade de erro.

Notou-se, conforme as Tabelas 2 e 3, que a raça 23 mostrou melhor porcentagem de incidência do fungo somada a porcentagem de sementes não germinadas (PSNG), com o uso de sacarose no tempo de 96 horas e com um potencial osmótico de -0,6 Mpa, visto que ocorreram valores de 57,6% de PSG e 78,0% de incidência do fungo. Já para a raça 2 de *C. lindemuthianum* (Tabelas 4 e 5), ocorreram valores superiores de PSG e de incidência, entre os potenciais de -0,8 e -1,0 Mpa, também com tempo de 96 horas, porém, pode ser dito que o potencial e soluto osmótico que demonstraram valores superiores de PSG e incidência do fungo simultaneamente foi NaCl no potencial de -1,0 Mpa (57,0% de incidência e 26,2% de PSG). Para a raça 2047 (Tabelas 6 e 7), ocorreram valores superiores para incidência entre os potenciais de -0,8 e -1,0 Mpa, utilizando sacarose, com 96 horas de inoculação e com relação a germinação de sementes o melhor resultado foi observado com NaCl quando usou-se o potencial de -1,0 Mpa.

Conforme resultados de incidência, o tratamento -0,6 Mpa com 168 horas de incubação mostrou-se semelhante à testemunha (0,0 Mpa) para as três raças do fungo, diferenciando-se apenas no tempo de 96 horas e para as raças 2047 e 2. Já com relação à germinação de sementes, a raça 2, no potencial -0,6 Mpa e com 168 horas de incubação não obteve diferença estatística da testemunha, e para a raça 2047 mostraram-se semelhantes entre si, os tratamentos -0,6 e -0,8 Mpa no mesmo tempo, porém, todos os tratamentos diferenciaram-se estatisticamente da testemunha.

À medida que diminuiu o potencial hídrico, reduziu a porcentagem de sementes germinadas. As diferenças que ocorreram podem estar relacionadas às diferenças de toxidez destes solutos e também às diferenças de potencial hídrico de equilíbrio exigido entre a semente e o meio externo, para que ocorra a germinação, que segundo COUTINHO (2000) podem variar amplamente em função das características exigidas entre as cultivares, e também entre lotes de uma mesma cultivar. No presente estudo ocorreram algumas diferenças entre o sal e o açúcar no que diz respeito à germinação, e inoculação das sementes de feijão. Alguns autores atribuem estas diferenças à maneira com que a semente absorve estes solutos, características da semente e potencial de equilíbrio específico entre a semente e o meio externo (COUTINHO et al., 2001). As diferenças também podem ser atribuídas à capacidade da semente em conseguir retirar água do meio de cultura para que inicie ou continue seu processo de germinação (HEYDECHER, HIGGINS E TURNER, 1975 apud COUTINHO, 2001). Os resultados deste trabalho são similares ao trabalho realizado por CARVALHO (1999), onde potenciais entre -0,8 e 1,0 Mpa foram suficientes para impedir a germinação de sementes de feijoeiro inoculadas com *C. lindemuthianum* usando BDA + manitol, e o potencial de -1,0 Mpa obteve maior infecção das sementes. A germinação das sementes no tempo 168 horas foi consideravelmente maior em relação ao tempo 96 horas, isto pode ser explicado retornando a uma das funções da restrição hídrica, onde esta aumenta a segunda fase da germinação (embebição), porém, no tempo 168 horas ocorre que os solutos osmóticos não conseguem impedir a entrada de água na semente e alongar a segunda fase da germinação, e então ocorre a emissão da radícula.

O efeito positivo da sacarose pode ser atribuído a ser fonte de carbono adicional, utilizado como fonte de energia para o fungo. Em trabalhos realizados por CARVALHO et al. (2001), foi positivo o efeito do manitol adicionado ao BDA no crescimento micelial de *C. lindemuthianum* comparados com a adição de PEG no meio de cultura. Na inoculação de *Diplodia maydis*, *Fusarium moniliforme* e *Chephalosporium acremonium* em sementes de milho usando restrição hídrica, MACHADO et al. (2001a), obtiveram melhores efeitos com o uso de manitol em potenciais hídricos de -0,8 a 1,0Mpa. O manitol também apresentou efeito positivo na inoculação de *Colletotrichum truncatum*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Phomopsis sojae* em sementes de soja sob estresse hídrico variando de -0,4 a 1,0 Mpa no meio de cultura BDA (MACHADO et al., 2001b).

Concluiu-se que o resultado do trabalho mostrou que ocorreu infecção favorável em níveis medianos de solutos no meio de cultura. Isto pode ser devido a níveis de solutos muito altos serem tóxicos para os fungos, fazendo com que não ocorra a infecção das sementes. Pela análise do trabalho, verifica-se que o processo de inoculação das sementes de feijão, por deposição de sementes secas sobre colônias de *C. lindemuthianum* cultivado em meio Mathur, acrescido de sacarose em quantidade suficiente para obter potenciais hídricos entre -0,8 e -1,0 Mpa, possibilita a obtenção de sementes viáveis infectadas por três raças diferentes.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. **Regras para a Análise de Sementes**. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, Brasília. 1992, 365 p.
- CARVALHO, J. C. B. de. **Uso da Restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*)**. Lavras, 1999, 98 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras.
- CARVALHO, J. C. B.; MACHADO, J. C.; VIEIRA, G. M. Crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum* em relação à restrição hídrica do substrato agarizado. **Ciência Agrotécnica.**, Lavras, v. 25, n. 4, p. 999-1005, 2001.
- COUTINHO, W. M. Uso da restrição hídrica no controle de germinação de sementes de Arroz (*Oryza sativa*) e Feijão (*Phaseolus vulgaris*) em testes de sanidade. Lavras, 2000. 78p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras.
- COUTINHO, W.M .; MACHADO, J.C.; VIEIRA, M.G.G.C. 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**, Pelotas, v. 23, n. 2, p. 127-135, 2001.
- COOK, J. R.; PAPENDICK, R. I. Role of water potential in microbial growth and development of plant disease, with special reference to postharvest pathology. **Hort Science**, Alexandria, v. 13, n. 5, p. 559-564, 1978.
- MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 23, n.2, p. 88 - 94, 2001 a.

REY et al. Inoculação de sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) com *Colletotrichum lindemuthianum* usando diferentes níveis de restrição hídrica

MACHADO, J. C. et al.. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.23, n. 2, p. 95-101, 2001 b.

MICHEL, B.E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potencial to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Stanford, v. 87, p.126-130,1995.

PASTOR-CORRALES, M. A. La Antracnosis del frijol comum, *Phaseolus vulgaris*, em América Latina. **Documento de Trabajo**, n. 113. 251 p. Programa Del Frijol, CIAT, Cali, Colômbia. 1992.

PEREZ, A. P.; NASSER, L. C.; MACHADO, J. C. Use of semi-seletive media for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on bean and soybean seeds. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 123-126, 2002.

SALISBURY, F. B. ; ROSS, C. W. **Plant Physiology**. 4 ed. Belmonte: Wadsworth. 1992. 682p.

TUITE, J. Plant Pathological Methods - Fungi and Bacteria. In: **Media and their ingredients**. Ed. Burgess Publishing Company, 1969, cap. 2, 49 p.