

METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO DO FUNGO *Bipolaris Sorokiniana* EM SEMENTES DE CEVADA EM MEIO DE CULTURA COM RESTIÇÃO HÍDRICA

Giovanna Seron¹, Celso Martins França², Paula Cristina dos Santos³, Priscila Angelotti-Zampar⁴, Dauri José Tessmann⁵

¹Acadêmica do Curso de Agronomia, Campus Maringá/PR. Universidade Estadual de Maringá – UEM. Programa de Iniciação Científica – PIC/UEM. Giovannaseron2@gmail.com

²Acadêmico do Curso de Agronomia, Campus Maringá/PR. Universidade Estadual de Maringá – UEM. Bolsista MEC/SESu.

³Mestranda em Proteção de Plantas, Campus Maringá/PR. Universidade Estadual de Maringá.

⁴Doutoranda em Proteção de Plantas, Campus Maringá/PR/ Universidade Estadual de Maringá.

⁵Orientador, Professor Doutor, Departamento de Agronomia, Campus Maringá/PR. Universidade Estadual de Maringá.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento *in vitro* do fungo *Bipolaris sorokiniana* em meio batata-dextrose-ágar (BDA) modificado mediante a adição de quatro diferentes restritores hídricos (sacarose, manitol, NaCl e KCl) com diferentes potenciais osmóticos (-0,4, -0,6, -0,8 e -1,0 MPa). Como testemunha foi utilizado meio BDA sem adição de restritor hídrico. Discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram transferidos para placas de Petri contendo o meio BDA. As placas foram incubadas em BOD a 23 °C com fotoperíodo de 12 horas e a avaliação do crescimento micelial foi realizada após sete dias e expressa em mm/dia. Na segunda parte do experimento foi realizado o teste de germinação das sementes de cevada submetidas a diferentes tempos de infecção do fungo. A avaliação da germinação foi realizada com o teste em rolo de papel e em caixas gerbox, e os resultados foram obtidos após sete dias de incubação. Para avaliar a infecção do fungo, as sementes foram depositadas em caixas gerbox e avaliadas sob lupa com aumento de até 40X, após dez dias de incubação. O ensaio foi conduzido com delineamento estatístico completamente casualizado e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância. Com os resultados obtidos, concluiu-se que os restritores hídricos não interferem no crescimento micelial do fungo. Quando utilizado a sacarose com potencial osmótico -0,4 MPa no meio, a faixa de tempo para a infecção de sementes que apresentou melhor resultado foi de 72 e 96h, no qual não interferiu na germinação da semente.

PALAVRAS-CHAVE: Crescimento micelial; Inoculação artificial; Restrição hídrica.

1 INTRODUÇÃO

O fungo *Bipolaris sorokiniana* é um importante patógeno da cevada no Brasil. O patógeno causa as doenças denominadas de macha marrom nas folhas e podridão comum das raízes, as quais reduzem o rendimento de grãos da lavoura e a qualidade dos grãos colhidos (FORCELINI e REIS, 2005).

A qualidade dos grãos da cevada é de extrema importância devido a sua utilização na produção de malte, no qual é a principal matéria prima para a indústria cervejeira. No ano de 2019, o Brasil produziu 400.415 toneladas de cevada (NOGUEIRA, 2020), entretanto esse volume de produção é insuficiente para o atendimento da demanda nacional para esse cereal.

Este estudo teve a finalidade de desenvolvimento de uma metodologia para a inoculação artificial de *Bipolaris sorokiniana*, pois sementes de cevada inoculadas com esse patógeno são utilizadas em diversas pesquisas fitopatológicas, como tratamento de sementes e desenvolvimento de métodos de manejo das doenças causadas por esse fungo (FARIAS *et al.*, 2010).

O objetivo do trabalho foi avaliar o emprego de quatro diferentes restritores hídricos (sacarose, manitol, KCl e NaCl) com em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) no crescimento micelial de *B. sorokiniana* e verificar se os restritores hídricos com diferentes potenciais osmóticos (-0,4, -0,6, -0,8 e -1,0 MPa) possuem efeito deletério na germinação das sementes de cevada.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Maringá. No primeiro experimento, foi avaliado o efeito do meio BDA osmoticamente modificado através da adição de quatro diferentes restritores hídricos, sendo eles o manitol, sacarose, NaCl e KCl, no crescimento micelial do *B. sorokiniana*. Os potenciais osmóticos utilizados em cada restritor foram de 0,0, -0,4, -0,6, -0,8 e -1,0 MPa, nos quais as concentrações de cada soluto foram devidamente ajustadas e feito a preparação do meio de cultura modificado. Posteriormente, os meios foram vertidos em placas de Petri com 9 cm de diâmetro em um volume de aproximadamente 20 mL de meio por placa. Após a solidificação do meio de cultura, foi realizado a repicagem do fungo, previamente identificado por PCR, através de disco de micélio de 5 mm de diâmetro e transferido para o centro da placa de Petri contendo o meio BDA. As placas inoculadas foram mantidas em câmara de crescimento de microrganismo, na temperatura ao redor de 23 °C com fotoperíodo de 12 horas. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos, no qual quatro eram os restritores hídricos e um a testemunha, no que se refere ao meio BDA sem adição de restritor, e com seis repetições (placas) para cada tratamento. A avaliação do crescimento micelial foi realizada após sete dias e expressa em mm/dia, os dados obtidos foram submetidos a análise de regressão.

No segundo experimento foi realizado a avaliação do tempo de incubação das sementes infectadas. Para fazer a infecção artificial das sementes de cevada, foi utilizado placas de Petri colonizadas com *B. sorokiniana* em meio BDA contendo sacarose com potencial osmótico de -0,4 MPa. Após a placa estar totalmente tomada pelo micélio do fungo, com aproximadamente 10 dias depois da incubação, 200 sementes de cevada foram colocadas nas placas, onde permaneceram por 24, 48, 72 e 96 horas. Posteriormente ao período de incubação, as sementes foram avaliadas de duas formas. A primeira avaliação foi feita em sementes incubadas em meio de cultura sem a presença do fungo e o teste de germinação foi realizado através do rolo de papel germitest, previamente umedecido com água destilada. Já o segundo método, as sementes foram incubadas em meio de cultura com a presença do fungo, o teste de germinação e de infecção foram feitos em caixas gerbox, com 20 sementes, contendo papel germitest umedecido com água destilada. A avaliação da germinação das sementes foi realizada após 7 dias de incubação e o percentual de infecção foi feito após 10 dias.

Para a análise estatística, os dados obtidos foram submetidos a análise de regressão pelo programa Sisvar.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando analisado o crescimento micelial do fungo *B. sorokiniana* em meio de cultura modificado com restritores hídricos, foi possível observar que, quando comparado com a testemunha, nenhum restritor hídrico apresentou diferença significativa ($P=0,05$). Sendo assim, todos os restritores utilizados no estudo, foram considerados eficazes no crescimento do fungo (Figura 1).

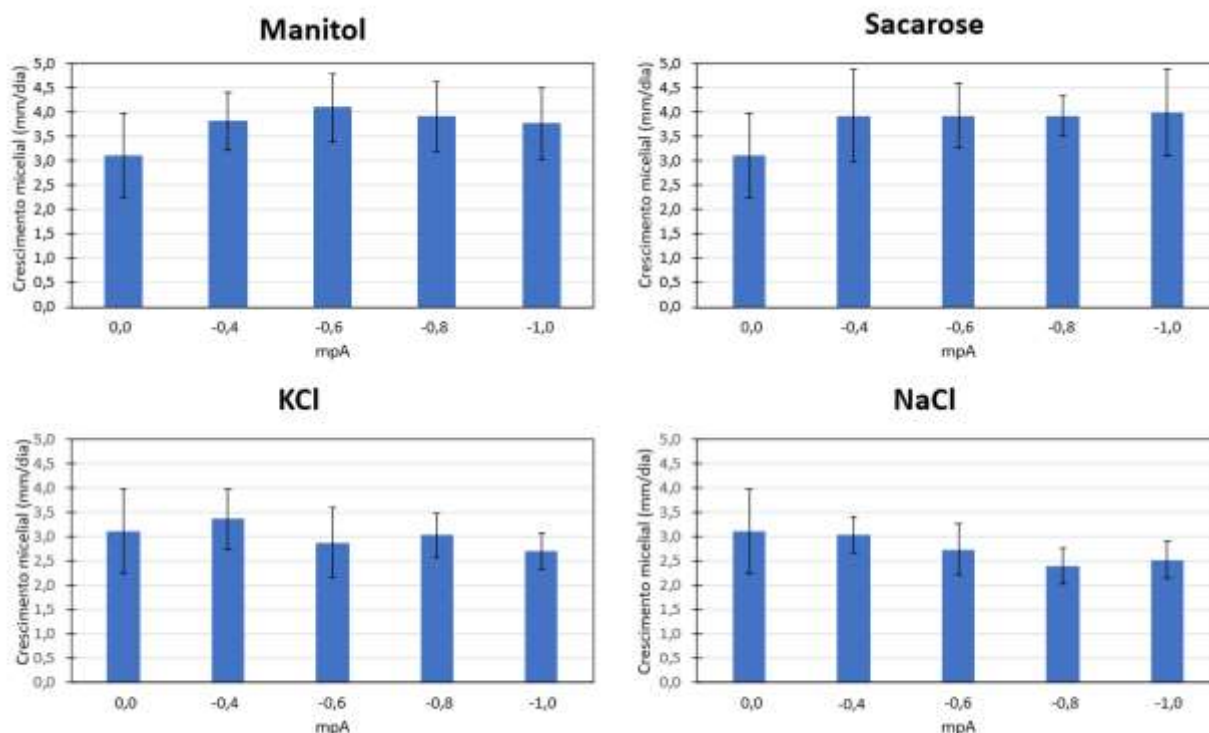


Figura 1: Efeito dos restritores hídrico manitol, sacarose, KCl e NaCl adicionados ao meio de cultura de batata-dextrose-ágar sob o crescimento do fungo *B. sorokiniana*.

Fonte: Dados da pesquisa, 2021.

Devido ao fato dos restritores hídricos não terem apresentado diferença, a sacarose foi a substância escolhida para realizar os próximos experimentos e o potencial osmótico foi de -0,4 MPa. Ao analisar os resultados da infecção foi possível observar que quanto maior o tempo de inoculação da semente, maior a taxa de infecção. A relação entre a média de infecção e a duração do tempo de inoculação foi descrita por regressão linear (Figura 2). O tempo que apresentou maior índice de infecção de 96 horas, com a média de 90,8% respectivamente.

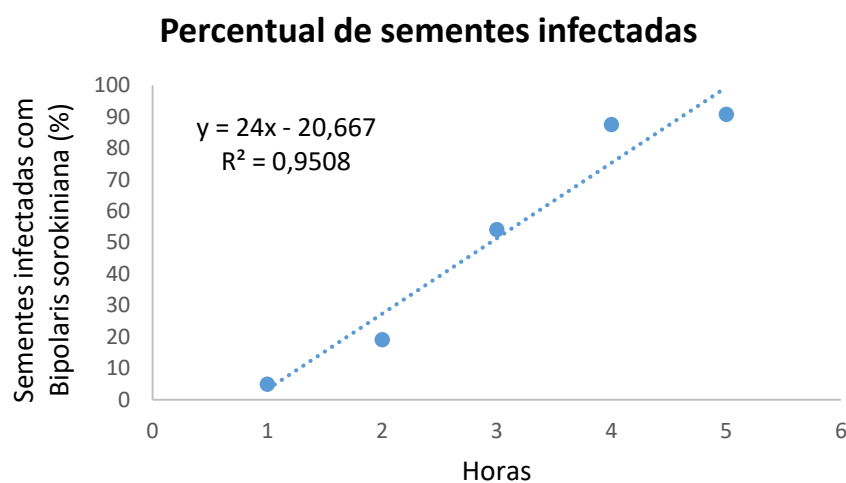


Figura 2: Efeito do tempo de inoculação do fungo *B. sorokiniana* na infecção de sementes de cevada em meio de cultura BDA com sacarose e potencial osmótico de -0.4 mpA.

Fonte: Dados da pesquisa, 2021.

Quanto a germinação de sementes, com os dados obtidos, foi possível observar que não ocorreu diferença significativa entre o tempo de exposição das sementes de cevada ao fungo cultivado em meio de cultura modificado, contendo sacarose como restritor hídrico. Sendo assim, o restritor hídrico não interferiu no poder germinativo da semente (Figura 3).

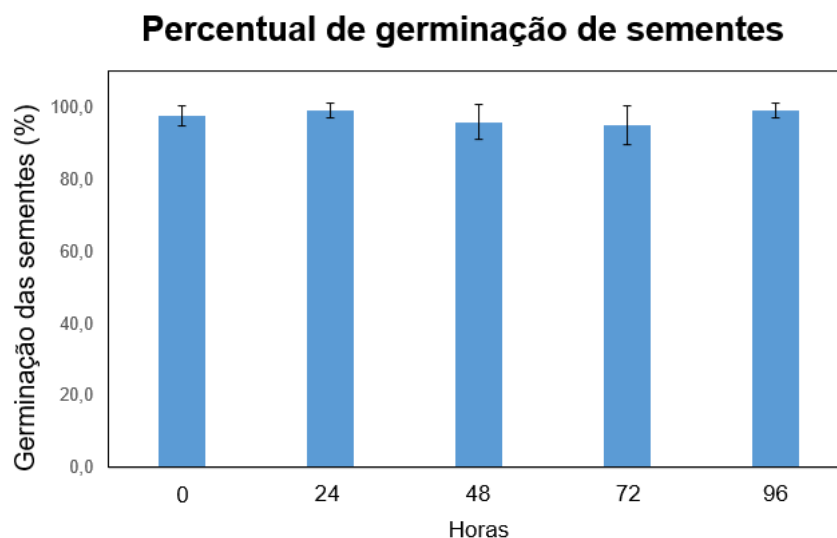


Figura 3: Germinação de sementes de cevada submetidas a diferentes tempos de incubação em meio de cultura BDA contendo sacarose como restritor hídrico com potencial osmótico de -0.4 MPa.

Fonte: Dados da pesquisa, 2021

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o presente trabalho, foi possível concluir que os restritores hídricos utilizados no estudo, que são eles o manitol, sacarose, NaCl e KCl, não influenciam negativamente no crescimento micelial do fungo *B. sorokiniana*, portanto, podem ser utilizados em protocolos de inoculação deste fungo em sementes. O tempo de exposição das sementes ao fungo no meio de cultura com o restritor hídrico não influenciou a taxa de germinação das sementes.

REFERÊNCIAS

FARIAS, C. R. J.; DEL PONTE, E. M.; CORRÊA, C. L.; AFONSO, A. P. S.; PIEROBOM, C. R. Infecção de sementes de trigo com *Bipolaris sorokiniana* pela técnica de restrição hídrica. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, p. 253-257. 2010.

FORCELINI, C.A., REIS, E.M. Doenças da cevada. *In*: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia. Doenças de Plantas Cultivadas**. v. 2. São Paulo: Ceres, 2005. p. 231-234.

NOGUEIRA, R. C. **Prognóstico cevada**. Departamento de Economia Rural – DERAL. Outubro, 2020.