



Inoculação artificial de *Fusarium oxysporum* em sementes de *Phaseolus vulgaris*

Artificial inoculation of *Fusarium oxysporum* in seeds of *Phaseolus vulgaris*

G.F. Rodrigues¹; P. Migliorini^{1*}; E. Junges²; R.N.O da Silva¹; H.L. Chagas¹; A. Nunes¹; J.A. Gularte¹; L.V.M. Tunes¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência & Tecnologia de Sementes, Universidade Federal de Pelotas, 96010-610, Pelotas-RS, Brasil

²Departamento de Defesa Fitossanitária, Instituto Federal Farroupilha, 97420-000, São Vicente do Sul, RS, Brasil

*pati.migliorini@gmail.com

(Recebido em 12 de abril de 2016; aceito em 23 de maio de 2016)

Inúmeras doenças que afetam a cultura do feijoeiro são transmitidas por sementes para tal, são importantes estudos com sementes infectadas que produzam plântulas viáveis. Dessa forma, o objetivo no trabalho foi testar diferentes métodos de inoculação de *Fusarium oxysporum* em sementes de feijão e verificar seu efeito no desenvolvimento das plântulas. Utilizou-se sementes da cv. BRS Expedito, as quais foram inoculadas pelos métodos de suspensão de esporos, de contato com restrição hídrica e inoculação do substrato com discos de BDA contendo micélio do fungo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito repetições. Foram feitas avaliações de emergência, comprimento e massa seca de parte aérea e incidência de sintomas da doença no hipocótilo e folha. A inoculação do patógeno *Fusarium oxysporum* em sementes de feijão influencia negativamente o desenvolvimento das plântulas. O método de suspensão de esporos produz sintomas da doença com o menor comprometimento do desenvolvimento das plântulas.

Palavras-chave: feijão, murcha de fusário, métodos de inoculação

Several diseases that affect the bean crop are transmitted by seeds for such studies are important to infected seeds that produce viable seedlings. Thus, the objective of this study was to test different *Fusarium oxysporum* inoculation methods in bean seeds and its effect on seedling development. They were used seeds of the cv. Expedito BRS, which were inoculated by the spores suspension methods, water contact constraint and inoculating the substrate with BDA discs containing mycelia. The experimental design was completely randomized with eight repetitions. They were made emergency assessments, length and dry mass of shoots and incidence of symptoms of the disease in stem and leaf. Inoculation of the pathogen *Fusarium oxysporum* in bean seeds negatively affects the development of seedlings. The spore suspension method produces symptoms of the disease with the least impairment in the development of seedlings.

Keywords: bean, fusarium wilt, inoculation methods.

1. INTRODUÇÃO

Para obtenção de um bom desempenho de plantas e alta produtividade na cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) fatores como a utilização de variedades melhoradas e um manejo adequado da cultura não devem ser considerados de forma isolada. O uso de sementes de alta qualidade também é fator importante. Em especial a qualidade das sementes está associada aos atributos de qualidade física, fisiológica, genética e sanitária [2].

Muitas são as doenças de importância para a cultura do feijoeiro as quais na grande maioria são disseminadas por sementes, dentre elas a murcha do fusário que é causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* [1]. As sementes podem transportar inóculo do fungo e dar origem a epidemias em áreas agrícolas, devido principalmente ao fato das estruturas permanecerem viáveis durante o período de armazenamento [12].

O método de inoculação em sementes tem por objetivo assegurar que os sintomas típicos da doença se expressem e se reproduzam nas plântulas, entretanto não comprometendo o potencial germinativo e emergência dessas [13]. O método mais simples de inoculação consiste na imersão das sementes numa suspensão de esporos [10-13]. Outra técnica bastante promissora é por meio

do condicionamento fisiológico ou também chamado de condicionamento osmótico. Esse método já conhecido em tecnologia de sementes para a potencialização do processo de germinação de algumas espécies também é testado em metodologia de inoculação de sementes com alguns fungos e bactérias [4-9-10]. Também é possível realizar a colonização do substrato, já que *Fusarium oxysporum* pode sobreviver nessas condições, e a sobrevivência em restos culturais é uma forma de inóculo primário da doença [5]. Entretanto, estas técnicas podem não fornecer as condições necessárias para que o fungo infecte as sementes, sendo necessário o aumento do tempo de contato do fungo com a semente.

Diante disso, o objetivo no presente trabalho foi testar diferentes métodos de inoculação de *Fusarium oxysporum* em sementes de feijão e verificar seu efeito no desenvolvimento das plântulas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Ciência e Tecnologia de Sementes, da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel” (FAEM), da Universidade Federal de Pelotas – RS. Foram utilizadas as sementes da cultivar BRS Expedito safra 2014/2015, com germinação de 82%, e 79,5 % de incidência de *Fusarium* sp.; 20,5% para *Aspergillus* sp.; *Alternaria* sp. 19%; *Cladosporium* sp. 2% e *Collethochum* sp. 0,5%. Para eliminar os fungos contaminantes presentes na superfície da semente, as mesmas foram previamente desinfestadas superficialmente com álcool 70% e hipoclorito de sódio a 1% por um minuto cada, seguidas de três lavagens rápidas em água esterilizada e secadas em condições de ambiente de laboratório.

O *Fusarium oxysporum* foi isolado a partir de fragmentos de caule de plantas de feijão sintomáticas, coletadas em área de produção de sementes no município de Primavera do Leste, MT. Os quais foram desinfestados em álcool 70% e hipoclorito a 1%, e três banhos em água destilada e esterilizada, por um minuto em cada etapa. Os fragmentos foram mantidos em ambiente estéril até a secagem sendo, a seguir, colocados sobre meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) e incubadas a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, após o crescimento do patógeno foi realizada repicagem para meio BDA, até a obtenção de uma cultura pura [7].

Os tratamentos foram constituídos de três métodos de inoculação em sementes, mais a testemunha, que são descritos a seguir:

Método com suspensão de esporos - o fungo obtido de uma cultura pura foi cultivado em meio BDA e incubado por 15 dias em câmara de crescimento com temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h. Após, adicionou-se 10 mL de água destilada e esterilizada em placas, e com auxílio de um pincel esterilizado, homogeneizou-se a massa de esporos, e em seguida, filtrou-se essa suspensão para retirada de impurezas. Posteriormente, foi utilizada 10 mL da suspensão contendo uma concentração 5×10^5 de esporos por mL, quantificados em hemacitômetro para cada 40 g de sementes. As sementes permaneceram em embebidas com a suspensão por 5 minutos, quando foi drenado o excedente de água e mantidas em ambiente estéril [13].

Método de contato com o patógeno em meio de cultura com restrição hídrica - discos com 7 mm de diâmetro, contendo micélio e esporos do isolado foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA modificado (restrição hídrica) com soluto de sacarose no potencial hídrico $-0,6\text{ MPa}$ [4]. As placas foram colocadas em câmara crescimento por quinze dias a temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e com fotoperíodo de 12 h.

Em seguida foram utilizadas quatro placas que apresentavam colônia fúngica com crescimento completo no diâmetro total de 9 cm. Nestas placas foram depositadas trinta sementes em cada placa, distribuídas em fileiras, levemente prensadas sobre o meio. As sementes foram retiradas após 48 h e postas para secar sobre papel filtro em temperatura ambiente [4].

Inoculação com discos de BDA contendo micélio e esporos do fungo - o cultivo do fungo ocorreu em câmara de crescimento com temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h durante quinze dias. O meio de cultura utilizado para o crescimento da colônia foi BDA. Para infestação do substrato, cinco discos de micélio foram retirados da colônia e depositados em copos plásticos de 200 mL contendo substrato vermiculita autoclavada e previamente umedecida com água

destilada e esterilizada, sendo posteriormente acondicionados em sacos plásticos devidamente fechados e levados para a câmara de crescimento por sete dias a temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e com fotoperíodo de 12 h [6].

Decorrido o procedimento de inoculação do substrato, e das sementes pelo método de contato direto e suspensão de esporos realizou-se a semeadura das sementes de feijão na profundidade de 2 cm, em copos plásticos de 200 mL contendo substrato de vermiculita esterilizada. Cada tratamento continha 40 sementes, distribuídas em oito repetições de cinco sementes. No tratamento testemunha (controle) utilizou-se sementes não inoculadas. Os tratamentos foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12h, durante quinze dias.

As variáveis avaliadas foram:

Emergência – avaliaram-se as plântulas emergidas aos 10 (E10) e aos 15 (E15) dias após a semeadura (DAS), sendo os resultados expressos em porcentagem.

Comprimento de parte aérea – aos 10 (CPA10) e 15 (CPA15) DAS, plântulas normais de cada repetição foram avaliadas pela medida do início do hipocótilo até o ápice da folha mais nova, mensurada com auxílio de uma régua graduada em centímetros, sendo os resultados expressos em cm/plântula.

Massa seca de parte aérea (MSPA) – aos 15 DAS parte aérea de plântulas normais de cada repetição foram dispostas para secar em estufa regulada a 70°C , até atingirem peso constante, obtido em 72 horas. Após estas foram pesadas e os resultados expressos em g/plântula.

Incidência de doença – a avaliação foi realizada aos 15 DAS, foram observadas sintomas em hipocótilo e folha de todas as plântulas de cada repetição dos tratamentos, sendo os resultados expressos em porcentagem de plântulas com incidência de sintomas em folhas (IF) e incidência no hipocótilo (IH).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, sendo constituído por quatro tratamentos e oito repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$) no programa estatístico SISVAR.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 encontram-se os resultados de emergência de plântulas aos 10 (E10) e 15 (E15) dias após a semeadura (DAS), comprimento de parte aérea aos 10 (CPA10) e 15 (CPA15) DAS e massa seca de parte aérea (MSPA) em função de diferentes métodos de inoculação de *Fusarium oxysporum* em sementes de feijão. Observa-se que plântulas emergidas das sementes não inoculadas (testemunha) tiveram uma maior emergência avaliada aos 10 DAS, porém não diferindo estatisticamente dos métodos de inoculação de contato com o patógeno e de suspensão de esporos. Para a emergência aos 15 DAS os diferentes tratamentos não demonstraram influência no desempenho das plântulas de feijão.

As diferentes técnicas de inoculação devem garantir a infecção das sementes sem comprometer o potencial germinativo e emergência das plântulas em estudo [13]. Alguns autores observam que quanto maior é o nível de infecção do patógeno as sementes, através da exposição dessas por diferentes tempos de contato com o fungo, resulta em um maior número de sementes mortas e conseqüentemente diminuição na porcentagem de germinação e emergência das plântulas, devido principalmente a morte do embrião [3-4-8-11].

Em estudos realizados por Sousa et al. (2008) [13], maiores porcentagens de germinação foram vistos quando as sementes de algodão permaneceram em contato com os conídios de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, do que em relação as sementes que ficaram em contato com o micélio fúngico desenvolvido sobre o substrato.

Na avaliação de comprimento de parte aérea aos 10 dias após a semeadura (Tabela 1), pode-se observar que os tratamentos com inoculação com discos de micélio no substrato, o método de suspensão de esporos e a testemunha tiveram melhor desempenho no comprimento de plântulas, em relação ao método de contato, porém esse não diferiu significativamente do método de suspensão. Resultados semelhantes foram verificados para emergência aos 15 DAS, evidenciando

assim a influência negativa durante o desenvolvimento das plântulas de feijão pelos métodos de contato e o de suspensão de esporos em comparação com a testemunha não inoculada.

*Tabela 1. Emergência de plântulas de feijão aos 10 (E10) e 15 (E15) dias após a semeadura (DAS), comprimento de parte aérea aos 10 (CPA10) e 15 (CPA15) DAS e massa seca de parte aérea (MSPA), em função de diferentes métodos de inoculação de *Fusarium oxysporum* em sementes. Pelotas, 2016.*

Tratamento	E10	E15	CPA10	CPA15	MSPA
	-----(%)----		-----(cm/plântula)----		(g/plântula)
Testemunha	89 a*	93 a	13.9 a	16.0 a	0.094a
Contato	74 ab	78 a	9.4 b	11.7 c	0.079a
Discos	71 b	78 a	14.5 a	15.0 ab	0.089a
Suspensão	83 ab	86a	12.0 ab	12.5 bc	0.095a
Média	79	83	12.45	13.79	0.089
CV(%)	7.46	9	15.81	16.96	18.62

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. **Testemunha:** sementes não inoculadas; **Contato:** método de contato com o patógeno em meio de cultura BDA com restrição hídrica; **Disco:** inoculação do substrato com discos de BDA contendo micélio do fungo; **Suspensão:** método com suspensão de esporos.

A restrição hídrica utilizada no método de contato das sementes restringe a disponibilidade da água, que é um componente elementar nos processos fisiológicos das plantas e se faz ainda mais necessária nos períodos iniciais de desenvolvimento, assim como aumento do tempo de contato com o patógeno podem ter desfavorecidos o desempenho das plântulas de feijão. As técnicas de restrição hídrica, da maneira como vem sendo utilizada, e os métodos de inoculação de sementes possibilitam diferentes níveis de inóculo de acordo com o tempo de exposição da semente ao patógeno [3-4-8-11-13]. Sousa et al. (2008) [13] em estudos com inoculação de *Fusarium oxysporum* em sementes de algodoeiro, observaram que pelo método de suspensão de esporos se obteve plântulas menores quando comparadas a métodos quem envolviam a inoculação das sementes por contato, o que pode ter sido resultado de um maior nível de infecção das sementes inoculadas neste método.

Os dados obtidos nas avaliações do presente trabalho não foram significativos para massa de matéria seca de parte aérea (Tabela 1), demonstrando assim que os tratamentos estudados não influenciaram o acúmulo de massa seca das plântulas.

Com relação à incidência de sintomas da doença observada no hipocótilo (IH) (Figura 1), as plântulas do tratamento testemunha não mostraram qualquer infestação, mesmo com a presença de *Fusarium* sp. detectada na qualidade inicial das sementes, evidenciando assim que a desinfestação foi eficiente para a eliminação de fungos associados as sementes. O método de suspensão foi o que favoreceu uma maior porcentagem de incidência (Figura 1) quando comparado aos demais métodos. Já a técnica de inoculação do substrato por discos de micélio, teve uma menor incidência em relação ao de suspensão, porém não diferindo estatisticamente do método de contato. Os sintomas observados no hipocótilo foram rente ao solo, como manchas encharcadas evoluindo para lesões profundas e encolhimento do caule.

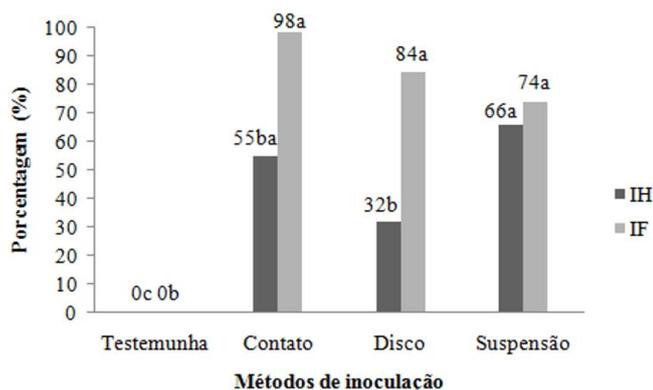


Figura 1. Incidência de sintomas da doença no hipocótilo (IH) e incidência de sintomas na folha (IF) em função de diferentes métodos de inoculação de *Fusarium oxysporum* em sementes. Pelotas, 2016.

Pode-se verificar que entre os métodos de inoculação de sementes não houve diferença significativa para incidência de sintomas da doença nas folhas (IF), somente para a testemunha (Figura 1). No entanto, nota-se que a incidência variou de 74 a 98 % nas plântulas que foram inoculadas com o *F. oxysporum*. Os sintomas observados foram clareamento das nervuras, com mudança da tonalidade verde para amarelo, seguidos de murcha e senescência das folhas.

SOUSA et al. (2008) evidenciaram um maior processo de infecção pelo método de inoculação por suspensão de esporos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em plântulas de algodão, em relação ao método de contato. Já Falcão et al. (2005) [6], observaram respostas insatisfatórias em termos de incidência de doença causada por *Sclerotinea sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* através da utilização do método de inoculação por discos de meio BDA com micélio para a contaminação do solo.

Os diferentes métodos de inoculação de *F. oxysporum* em sementes de feijão apresentaram eficácia no desenvolvimento de plântulas sintomáticas e também no comprometimento do desempenho das plântulas, além de que foi possível manter a viabilidade das sementes, destacando assim, o método de suspensão de esporos como o de melhor resposta, por obter níveis satisfatórios de infecção, ser um método simples e prático para a inoculação em sementes.

4. CONCLUSÃO

Plântulas de feijão têm seu desempenho prejudicado pela associação do *Fusarium oxysporum*.

Os métodos de inoculação por contato, suspensão e discos de micélio no substrato são eficientes para inocular sementes e produzir plântulas sintomáticas.

O método de suspensão de esporos apresenta níveis satisfatórios de sintomas da doença com menor comprometimento da emergência das plântulas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bianchini A, Maringoni AC, Carneiro SMPG. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA. Manual de Fitopatologia. São Paulo: Editora Ceres. v.2(4ed). 2005. 333-349p.
2. Binotti FFS, Haga KI, Cardoso ED, Alvez CZ, Sá ME, Arf O. Efeito do período de envelhecimento acelerado no teste de condutividade elétrica e na qualidade fisiológica de sementes de feijão. Acta Sci. Agron. 2008 June; 30(2): 247-254, doi: 10.1590/S1807-86212008000200014
3. Botelho LS, Zancan WLA, Machado JC, Barrocas EN. Performance of common bean seeds infected by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. J. Seed Sci. 2013; 35(2):153-160, doi: 10.1590/S2317-15372013000200003.

4. Costa MLN, Machado JC, Guimarães RM, Pozza EA, Oride D. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. *Ciênc. agrotec.* 2003 Oct: 27(5):1023-1030, doi: 10.1590/S1413-70542003000500008
5. Ethur LZ, Blume E, Muniz MFB, Flores MG. Seleção de antagonistas fúngicos a *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* em substrato comercial para mudas. *Cienc. Rural*, 2007 Nov/Dez: 37(6): 1794-1797, doi: 10.1590/S0103-84782007000600047
6. Falcão JV, Orili FP, Ávila ZR, Mello SCM. Estabelecimento de metodologia para contaminação de solo com propágulos dos fungos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii*, e expressão de doença em soja. Comunicado Técnico. Brasília. 2005. 6p.
7. Fernandes MR. Manual para laboratório de fitopatologia. Passo Fundo: EMATER – CNPT; 1993. 128p.
8. Galli JA, Panizzi RC, Vieira RD. Resistência de variedades de soja à morte de plântulas causada por *Colletotrichum truncatum*. *Arq. Inst. Biol.* 2007 Abr/Jun: 74(2): 163-165.
9. Menezes VO, Pedroso DC, Piveta G, Muniz MFB, Menezes NL, Garcia DC, Ethur LZ, Santos RF, Tunes LM. Detecção e influência de *Fusarium* spp. na qualidade fisiológica de sementes de pepino. *Cienc. Rural*. 2011 Fev: 41(2): 193-199, doi: 10.1590/S0103-8478201100500006
10. Pedroso DC, Menezes VO, Muniz MFB, Piveta G, Tunes LM, Muller J, Menezes NL. Métodos de inoculação de *Alternaria alternata* e *A. dauci* em sementes de salsa e sua influência na qualidade fisiológica. *Rev. bras. Sementes*. 2010 Sept: 32(3): 79-85, doi: 10.1590/S0101-31222010000300009.
11. Reis GF, Bacchi LMA, Gavassoni WL, Hirata LM, Pontim BCA. Viabilidade de armazenamento de sementes de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* em meio com restrição hídrica. *Summaphytopathol.* 2014 June: 40(2): 168-173, doi:10.1590/0100-5405/1908
12. Silva GC, Gomes DP, Kronka AZ, Moraes MH. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) provenientes do estado de Goiás. *Semina Cienc. Agrárias*. 2008 Jan/Mar: 29(1): 29-34, doi: 10.5433/1679-0359.2008v29n1p29
13. Sousa MV, Machado JC, Pfenning LH, Kawasaki VH, Araújo DV, Silva AA, Martini Neto A. Métodos de inoculação e efeitos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro. *Trop. Plant Pathol.* 2008 Jan/Fev: 33(1): 41-48, doi: 10.1590/S1982-56762008000100007