

## INOCULAÇÃO DE *FUSARIUM SEMITECTUM* EM SEMENTES DE SOJA NA PRODUÇÃO DE ESPOROS

ALICE BEATRIZ PEÑA MEDINA<sup>1</sup>; ROSARIA HELENA MACHADO AZAMBUJA<sup>2</sup>;  
MARIO FERNANDO PINEL ALVAREZ<sup>2</sup>; LUIZ GUILHERME LIDOINO DE  
CARVALHO<sup>2</sup>; CÂNDIDA JACOBSEN DE FARIAS<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas - [ecilabeatriz@gmail.com](mailto:ecilabeatriz@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas - [rosariahmz@gmail.com](mailto:rosariahmz@gmail.com); [maritopinel9@yahoo.com](mailto:maritopinel9@yahoo.com);  
[guilhermelidoino2000@gmail.com](mailto:guilhermelidoino2000@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas - [jacobsencandida@gmail.com](mailto:jacobsencandida@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

O fungo *Fusarium semitectum* caracteriza-se por ser um fungo necrotrófico e um dos mais frequente no plantio de soja, a pesar de não existir relato sobre a transmissão por sementes, podem causar podridão das mesmas durante a germinação em laboratório ou no campo (HENNING & FRANÇA NETO 1980), de maneira semelhante ao fungo *Phomopsis* sp. (HENNING 2004). Ademais, estudos demonstrados por GALLY et al. (1998; 2006), também relatam que espécies de *Fusarium*. intervêm negativamente no plantio, sobretudo afetando a qualidade e a emergência.

*F. semitectum* produz conídios fusiformes e multiseptos formados em micélio aéreo, em conidióforos ramificados, com estruturas semelhantes a uma meia lua quando observadas sob microscópio de luz. Alguns *F. semitectum* frutificam as estruturas de resistência denominados clamidósporos (AGRIOS, 2005; GOURLAT, 2018. MOHD et al, 2010).

Para o cultivo, desse microrganismo, utilizam-se meios de culturas necessários ao seu crescimento e reprodução. O meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) é o mais comum na rotina de fitopatologia, pois abrange a maioria dos fungos, usado basicamente para isolamento e manutenção de culturas (inóculo). Outro meio semelhante é a batata-sacarose-ágar (BSA), sendo recomendado na indução de esporulação de *Fusarium* spp. (ZAUZA; ALFENAS; MAFIA, 2007).

No entanto muitos meios induzem somente o desenvolvimento vegetativo do fungo dificultando, muitas vezes, os trabalhos que necessitam da parte reprodutiva. Logo, algumas modificações, como tempo de inoculação, fazem-se necessárias.

O objetivo deste estudo foi induzir a produção de conídios de *F. semitectum* em sementes de soja, no laboratório, utilizando os BDA e BSA em diferentes tempos de inoculação.

### 2. METODOLOGIA

O ensaio foi conduzido no Laboratório de Patologia de Sementes e Fungos Fitopatogênicos (LPSFF) do Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão de Leão. O isolado de *F. semitectum* foi obtida da coleção in vitro do LPSFF, sendo preservado em meio BDA a -5°C, e reativados em folhas de *Typha* sp. antes das instalações do ensaio.

O fungo foi repicado para tubos de ensaios com água destilada e contendo uma folha de *Typha* sp., depois de ser autoclavados, os isolados foram repicadas

nas folhas e na sala de crescimento com fotoperíodo de 12h a 25 °C, como meio para induzir a produção de conídios.

Posteriormente fez-se a repicagem do fungo para os meios de culturas a serem utilizados para inoculação artificial das sementes. Foram utilizados os meios: Batata-dextrose-ágar (BDA) (extrato de 200 g de batata, 20 g de dextrose, 20 g de ágar e 1000 mL água destilada) e o Batata-sacarose-ágar (BSA) (extrato de 200 g de batata, 20 g de sacarose, 20 g de ágar e 1000 mL água destilada). Após o preparo, dos meios procedeu-se a autoclavagem a 120 °C por 20 minutos. Sendo as sementes desinfestadas depositadas nas placas contendo os meios tanto BDA como BSA.

Posteriormente, procedeu-se a inoculação das sementes de soja. Para isso, em um primeiro momento, fez-se a desinfestação das sementes com uma solução de hipoclorito de sódio (5%) por 5 minutos, passadas em água estéril três vezes e secas em temperatura ambiente por 48 horas sobre papel filtro.

Em um segundo momento as sementes foram depositadas em camada única sob os meios de cultura por diferentes períodos de inoculação: 6h; 12h; 24h; 48h; 72h. Após, cada período de inoculação 100 sementes foram submetidas ao teste de qualidade sanitária, Blotter test conforme metodologia do MAPA (2009). As amostras foram examinadas sob microscópio estereoscópico para verificar a presença do fungo, observando-se a estrutura geral e ao microscópio óptico, a partir de lâminas microscópicas para visualizar a presença das estruturas reprodutivas do fungo, conídios (GOULART, 2018; HENNING, 2017). Sendo os resultados expressos em presença e ausência dos fungos de estrutura vegetativa e reprodutiva do fungo.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos verificou-se que o meio BSA a partir de 12h de inoculação teve-se uma incidência próximo de 100% (Tabela 1), porém não foi observado estruturas reprodutivas em microscópio estereoscópico. Apenas um crescimento excessivo do micélio que cobriram toda as sementes. A produção de esporos somente foi possível no tempo de 48h de inoculação. Na Figura 1, observa-se os resultados do meio BSA com sete dias de crescimento fungico, inoculação a partir de 48h permitiram contato e adesão dos conídios de *F. semitectum* em sementes.

Quando foram realizadas as inoculações das sementes o meio BDA, comum na rotina do laboratório o fungo tenha cobriu o diâmetro da placa, não foi possível o crescimento do micélio sobre a superfície das sementes e a produção de conídios foram ausentes. Mesmo resultado que o BSA, a partir de 12h de contato com o fungo. Cabe ressaltar que o ensaio foram examinadas por meio de microscopia clássica, detectando assim a presença da estrutura reprodutiva do fungo.

Tabela 1. Produção de conídios de *F. semitectum* em sementes de soja sob tempos diferentes de inoculação nos meios BDA e BSA.

Tratamentos Tempos de inoculação	Produção de conídios		Incidência (%)	
	BSA	BDA	Blotter test - BSA	Blotter test - BDA
6h	Ausente	Ausente	46	68
12h	Ausente	Ausente	97	100
24h	Ausente	Ausente	100	100
48h	Presente	Ausente	100	100
72h	Presente	Ausente	100	100



Figura 1. Inoculação de sementes com o BSA (a); Sementes inoculadas com *F. semitectum* (b) e; Conídios de *F. semitectum* (c).

Neste ensaio observou-se a importância da inoculação e como ela pode ser eficiente para *F. semitectum* em sementes de soja, sendo favorável o uso do meio BSA e um tempo de exposição a partir de 48 horas para a produção de conídios.

De acordo com SILVA & TEIXEIRA (2012), a esporulação e o crescimento micelial de *F. solani* em BDA e BSA promoveram um bom desempenho às exigências fisiológicas do fungo, sob regime de luz contínua, também na produção de picnídios de *Diaporthe citri* com o meio de cultura de aveia-ágar (NOZAKI, 2004). No entanto, outros fungos fitopatogênicos tais como, *Alternaria solani* (LUKENS, 1963) e *Mycosphaerella fijensis* (HANADA et al., 2002) induziram maior produção de esporos na ausência de luz, sendo este um foto-inibidor do crescimento micelial. Já para o *F. semitectum* ocorreu com fotoperíodo de 12h. MELLO et al. (2018), encontraram resultados específicos sob diferentes regimes de iluminação e estresse na *Corynespora cassiicola* em soja, rejeitando que o aumento do crescimento do micélio aumenta a produção de esporos.

#### 4. CONCLUSÕES

Desse modo, a inoculação contendo o meio BSA foi favorável para a produção de conídios no *F. semitectum* em sementes de soja, sendo recomendado para a inoculação artificial com alta produção de esporos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C. & FERREIRA, F.A. Capítulo 5: Inoculação de Fungos Fitopatogênicos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. (Ed.). **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: Editora UFV, 2007. p. 117-137.
- AMORIM, L. & PASCHOLATI, S. F. Parte I Conceitos básicos de fitopatologia: 4. Ciclo de relações patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica CERES, 2018. p.107-140. v. 1.: il. ISBN: 978-85-318-0056-6.
- AGRIOS, G. **Plant Pathology**. 5ed. Nueva York. Elsevier Academic Press. 922 p, 2005.
- BRASIL. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 200 p.
- COSTA, M.L.N.; MACHADO, J.C.; GUIMARÃES, R.M.; POZZA, E.A.; ORILE, D. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseolis* em sementes de algodoeiro através de restrição hídrica. **Ciência and Agrotecnologia**, Lavras,v.27,n.5, p.1023-1030, 2003.

- DA SILVA, J.L.; TEIXEIRA, R.N.V. Esporulação e crescimento micelial de *Fusarium solani* em diferentes meios de cultura e regimes de luminosidade. **Revista Agro@ambiente Online**, v. 6, n. 1, p. 47-52, 2012.
- GALLY, T.A.; PANTUSO, F.; GONZÁLEZ, B. Soybean seedling susceptibility to *Fusarium* spp. in Argentina. **Phytopathology** 88:S30, 1998.
- GALLY, T.; GONZÁLEZ, B. A.; PANTUSO, F. Efecto Conjunto de *Fusarium* sp. y *Phomopsis* sp., Patógenos Transmitidos por las Semillas em Plántulas de Soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v. 24, n. 2, p. 156-158, 2006.
- GOULART, A. C. P. **Fungos em sementes de soja: detecção, importância e controle**. 2.ed.rev.e ampl. Brasília, DF: EMBRAPA, 71 p., 2018: il.color.; 16 cm x 22cm. ISBN 978-85-7035-823-3.
- HANADA, R. E.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**. n 27, p. 170-173, 2002.
- HENNING, A. A.; FRANÇA NETO, J. de B. Problemas na avaliação da germinação de sementes de soja com alta incidência de *Phomopsis* sp. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 2, n. 3, p. 9-22, 1980.
- HENNING, A.A. **Patologia e Tratamento de Sementes: Noções Gerais**. Londrina: EMBRAPA Soja, 2004, n. 235. 51 p.; 21 cm. (Embrapa – CNPSo, Documentos, 235). ISBN 1516-781X.
- HENNING, A. A. **Guia práctica para identificar los hongos más frecuentes en semillas de soja**. Brasília, DF : Embrapa, 2017. 33 p. : il. color. ; 14 cm x 21 cm. ISBN 978-85-7035-734-2.
- LUKENS, R. J. Photo-inhibition of sporulation in *Alternaria solani*. **American Journal of Botany**, New York, v.50, n.7, p.721-724, 1963.
- MELLO, F. E. DE; SILVA, H. P. DA; CELESTINO, G. G.; LOPES, I. DE O. N.; BALBI-PEÑA, M. I.; GODOY, C. V. *Crecimiento micelial radial e esporulação de isolados de Corynespora cassiicola*. **Summa Phytopathologica**, v.44,n.4, p. 374–379. 2018.
- MOHD, M. H.; SALLEH, B.; ZAKARIA, L. Characterization and intraspecific variation of *Fusarium semitectum* (Berkeley and Ravenel) associated with red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton and Rose) in Malaysia. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n.3, p. 273-284, 18 January 2010.
- NOZAKI, M. DE H.; CAMARGO, M.; BARRETO, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes meios de cultura, condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.4, 429–432, 2004.
- RODRÍGUEZ-GUERRA, R.; LÓPEZ-ARROYO, J. I.; DÍAZ-MARTÍNEZ, S.; PEÑA-CARRILLO, K. I.; CAMACHO, A. P. M. Patogenicidad de cepas de *Fusarium semitectum* BERK. & Ravenel sobre *Diaphorina citri* Kuwayama Pathogenicity of *Fusarium semitectum* Berk & Ravenel strains on *Diaphorina citri* Kuwayama. **Biotecnología y Sustentabilidad**, v. 5, n. 1, p. 75-90, 2020.
- ZAUZA, E.A.V.; ALFENAS, A.C. & MAFIA, R.G. Capítulo 1: Esterilização, Preparo de Meios de Cultura e Fatores Associados ao Cultivo de Fitopatógenos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. (Ed.). **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: Editora UFV, 2007. p. 23-50.