

## Comparação entre Métodos de Avaliação de Transmissão de *Pyricularia grisea* através de Sementes em Triticale

Thais Dias Martins\*<sup>1</sup>, Norberto A. Lavorenti<sup>2</sup> & Alfredo S. Urashima\*\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnologia Vegetal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, CEP 13600-970, Araras, SP, e-mail: alfredo@dbv.cca.ufscar.br; <sup>2</sup>Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Socioeconomia Rural, CCA, UFSCar, Araras, SP

(Aceito para publicação em 17/02/2004)

Autor para correspondência: Alfredo S. Urashima

DIAS MARTINS, T., LAVORENTI, N.A. & URASHIMA, A.S. Comparação entre métodos para avaliação de transmissão de *Pyricularia grisea* através de sementes em triticale. Fitopatologia Brasileira 29:425-428. 2004.

### RESUMO

Triticale (*X. triticosecale*) é o mais novo hospedeiro de *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia grisea*), agente causal da brusone, no estado de São Paulo. Extensas áreas da cultura no sul do estado sofreram severas perdas no ano de 2001. Especula-se que sementes infetadas tenham sido de vital importância na ocorrência e disseminação do fungo. Entretanto, a transmissão do patógeno das sementes para plântulas ainda é motivo de controvérsia, tanto para brusone do arroz (*Oryza sativa*) como para brusone do trigo (*Triticum aestivum*). Um dos fatores para tal controvérsia pode estar nos métodos empregados nos diferentes estudos. O presente trabalho visou examinar a transmissão de *P. grisea* a partir de sementes de triticale, através de quatro diferentes metodologias, com 100% de sementes infetadas e em condições controladas de 21 °C e fotoperíodo de 12 h. Os tratamentos foram: a) sementes semeadas

em solo autoclavado seco; b) sementes semeadas em solo autoclavado encharcado; c) sementes semeadas em meio ágar-água; d) sementes semeadas em papel de filtro. O delineamento estatístico foi de blocos ao acaso com quatro repetições. Os resultados demonstraram que ocorreu a transmissão do patógeno das sementes para plântulas em todos os métodos testados, com dois tipos de sintomas: morte de plântulas e sintoma nas folhas primárias sem morte de plântulas. A taxa de transmissão desses sintomas foi similar em todos os tratamentos, sugerindo que qualquer um desses pode ser usado. A utilização de sementes infetadas também proporcionou emergência de plântulas sadias, sem sintomas visíveis da brusone.

**Palavras-chave adicionais:** *X triticosecale*, brusone, transmissão por sementes.

### ABSTRACT

#### Methods to examine transmission of *Pyricularia grisea* from seeds to seedlings of triticale

Triticale (*X. triticosecale*) is the most recent host of *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia grisea*), the causal agent of blast, in São Paulo state. Severe yield losses occurred in large areas in the southern part of the state in 2001. It is speculated that seed borne infection played a vital role in the outbreak and dissemination of this disease. Nevertheless, transmission of disease from seeds to seedlings is still a matter of controversy, in both rice (*Oryza sativa*) blast and wheat (*Triticum aestivum*) blast. One reason for this debate may be associated with the method used in those studies. The present work was designed to examine the seed borne transmission of *P. grisea*

from seeds to seedlings in triticale under different methods using 100% infected seeds and controlled temperature of 21 °C and 12 h cycles of light. The treatments were as followed: a) seeding in sterilized soil; b) moist but not flooded seeding in sterilized soil; c) seeding in water-agar media; d) seeding in filter paper. The treatments were arranged in a randomized block design with four replications. Transmission of *P. grisea* from seeds to seedlings was found in all methods with two types of symptoms: death of seedlings and symptoms on leaves with no death. The rate of transmission of these symptoms was similar in all methods, suggesting that any of these methods could be used. Healthy seedlings with no visible blast symptoms emerged from infected seeds in all methods.

O triticale (*X. triticosecale* Wittmack) é um híbrido artificial, desenvolvido na Europa, ao redor do ano 1800, que combina a potencialidade do rendimento e qualidade do trigo (*Triticum aestivum* L.) com a resistência do centeio (*Secale cereale* L.). Seus primeiros cultivares comerciais foram liberadas em 1969 e, desde então, têm-se destacado e atingido

importância econômica em diferentes partes do mundo. Sua produção é destinada tanto para o consumo animal, como humano e, entre seus principais produtores, destacam-se o Brasil e a África do Sul.

No Brasil, as principais áreas produtoras se concentram nas regiões Sul, Centro Oeste e Sudeste. Em São Paulo, na região do sul do estado, o triticale vem-se constituindo numa boa alternativa à cultura do trigo, devido à boa produtividade

\*Bolsista FAPESP IC 01/12745-3

\*\*Bolsista FAPESP JP 99/12269-5

e pela rusticidade, que acarreta um menor custo de produção em consequência da ausência de pulverização com fungicidas. Entretanto, no ano agrícola de 2001, verificou-se em extensas áreas de triticale uma acentuada queda de produtividade, em consequência de uma doença até então desconhecida que ocorreu em proporções epidêmicas. Através de análises laboratoriais e teste de patogenicidade, identificou-se o fungo *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. [teleom. *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr.] como agente causal dessa doença. Esse patógeno ocorre em mais de 50 gramíneas, sendo seu hospedeiro mais importante o arroz (*Oryza sativa* L.), onde causa a brusone, em diferentes áreas do mundo (Ou, 1985). No Brasil, outro importante hospedeiro desse patógeno é o trigo que desde 1985 vem sofrendo freqüentes quebras de produtividade em muitas regiões do país devido ao ataque deste fungo (Igarashi *et al.*, 1986). Em triticale, a primeira ocorrência dessa doença no país foi relatada na região centro sul do Estado do Paraná em 1995 (Mehta & Baier, 1998).

Sementes infetadas são consideradas uma das principais fontes de disseminação de diferentes doenças de plantas. No caso da brusone do arroz, esse assunto ainda é contraditório, pois sementes infetadas de arroz foram associadas à morte de plântulas (Ranganathiah *et al.*, 1979; Pande *et al.*, 1994; Long *et al.*, 2001), enquanto outros pesquisadores observaram baixa transmissão do fungo a partir de sementes (Lamey, 1970; Chung & Lee, 1983; Manandhar *et al.*, 1998). Uma das razões para esses resultados contraditórios pode ter sido as diferentes metodologias usadas nos estudos das sementes como agente transmissor da doença.

Dentre os métodos empregados para o exame de transmissão de *P. grisea* a partir de sementes estão os de ágar-água (Chung & Lee, 1983; Pande *et al.*, 1994), solo seco (Goulart & Paiva, 1993) e solo inundado (Manandhar *et al.*, 1998), todos realizados em condições ambientais específicas. O método ágar-água é bastante utilizado em análises de sanidade de sementes; o método de solo é empregado principalmente em ensaios de campo ou casa de vegetação, onde sementes com porcentagens conhecidas de infecção são semeadas diretamente no campo e a porcentagem de plântulas com lesão é avaliada (Goulart & Paiva, 1991; Goulart & Paiva, 1993). A característica desse método é que, por ser estudo de campo, existem muitas variáveis que podem afetar a transmissão do fungo. Uma pequena modificação nesse método foi empregada por Faiad *et al.* (1994), utilizando substrato seco com mistura de solo, areia e esterco sob condições controladas. Um método muito comum para determinação de sanidade de sementes é o do papel de filtro, que consiste em semear em papel de filtro sobre uma camada de algodão embebida de água destilada e esterilizada, e após seis-sete dias verificar os fungos presentes (Ranganathiah *et al.*, 1979; Goulart & Paiva, 1993; Pande *et al.*, 1994; Cornélio *et al.*, 2000).

O presente trabalho objetivou determinar a transmissão de *P. grisea* de sementes para plântulas de triticale sob diferentes metodologias em ensaios contendo apenas sementes infetadas pelo patógeno.

Sementes de triticale das variedades Embrapa 18 e IAC 03 foram coletadas de campos infetados por *P. grisea*, no município de Capão Bonito/São Paulo, em agosto de 2001, sendo essas preservadas em refrigerador, em temperatura de 4 °C e com emprego de sílica gel para mantê-las sob baixa umidade, no LAMAM (Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular) no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos. O estado sanitário foi avaliado empregando-se uma metodologia utilizada por Goulart & Paiva (1991): as sementes foram colocadas sobre folhas de papel de filtro umedecidas com água esterilizada contida no interior de placas de Petri; o ambiente de incubação consistiu de uma câmara de luz fluorescente, com temperatura de 21 °C e fotoperíodo de 12 h. No terceiro dia de incubação, as sementes foram examinadas sob microscópio estereoscópico.

Para o estudo de transmissão, foram empregadas apenas sementes cuja presença de *P. grisea* tivesse sido comprovada no teste de sanidade. Essas sementes em início de germinação foram submetidas a quatro diferentes tratamentos: solo autoclavado encharcado, solo autoclavado seco, papel de filtro e meio ágar-água. Para os três primeiros, o plantio foi feito em potes de polietileno de 10 cm de altura por 10 cm de diâmetro, sendo que, para solo encharcado e solo seco, foram usados 314cm<sup>3</sup> de substrato. O método papel de filtro foi uma adaptação do procedimento utilizado em testes de sanidade de sementes: no fundo do recipiente colocou-se uma camada de algodão hidrófilo que foi sobreposta por duas lâminas de papel de filtro; sobre essas folhas colocaram-se dez sementes. Para o método de ágar-água, o substrato foi vertido em um pote de vidro (17 cm de altura por 7 cm de diâmetro) com aproximadamente 153cm<sup>3</sup> do meio de cultura.

Em todos os tratamentos, os potes foram fechados com filme de PVC transparente e mantidos em condições controladas de 21 °C e fotoperíodo de 12 h, com luz branca, até o final das avaliações. Cada tratamento constou de dez sementes infetadas com quatro repetições, totalizando 40 sementes com 100% de infecção.

As avaliações foram realizadas aos 14 dias após a instalação do experimento, determinando-se a mortalidade das plântulas e a transmissibilidade de *P. grisea* (plântulas com sintomas de brusone nas folhas primárias). Para efeito de análise estatística (variância), o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições (potes com dez sementes, cada), sendo os dados originais transformados em  $\sqrt{(x + 0,5)}$  e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

De acordo com os dados obtidos (Tabela 1), a transmissão do patógeno da semente para a plântula ocorreu em todos os métodos, variando de 35,0 a 60,0%. A transmissão se verificou de duas formas: resultando em morte de plântulas ou ocorrendo na folha primária, sem ocasionar a morte da plântula. O maior percentual de mortalidade (47,5%) ocorreu no solo encharcado, seguido de solo seco (41,0%), papel filtro e ágar-água, esses últimos com mortalidade de 30,0% cada. Esses métodos, porém, não diferiram estatisticamente entre si, demonstrando assim, que o plantio de sementes contaminadas

**TABELA 1** - Transmissão de *Pyricularia grisea* de sementes para plântulas de triticales (*X. tritico-secale*) em função dos métodos

Método	Transmissão (%) <sup>1</sup>					
	Positiva <sup>2</sup>			Negativa <sup>3</sup>		
	com morte <sup>4</sup>	sem morte <sup>5</sup>	total	com morte	sem morte	total
Papel filtro	30,0a <sup>6</sup>	30,0a	60,0	12,5b	27,5a	40,0
Solo encharcado	47,5a	10,0a	57,5	32,5a	10,0a	42,5
Solo seco	41,0a	10,2a	51,2	33,3a	15,3a	48,6
Ágar-água	30,0a	5,0a	35,0	30,0a	35,0a	65,0

<sup>1</sup> Para comparação de médias os dados originais foram transformados para  $\sqrt{(x + 0,5)}$

<sup>2</sup> Presença de *Pyricularia grisea* constatada

<sup>3</sup> *P. grisea* não constatada

<sup>4</sup> Morte de plântulas devido a outros agentes que não *P. grisea*

<sup>5</sup> Plântulas visualmente sadias

<sup>6</sup> Médias seguidas de mesma letra não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

por *P. grisea* invariavelmente resultou em morte de plântulas, em todas as condições estudadas. Quanto à transmissão do patógeno para a folha primária sem a morte de plântulas, maior taxa de transmissão (30%) ocorreu no método do papel de filtro, sendo seguido pelos métodos solo seco, solo encharcado e ágar-água. Uma clara tendência de maior taxa de transmissão do patógeno para folhas primárias foi observada no método papel de filtro. Essa diferença, entretanto, não foi estatisticamente significativa a 5% de probabilidade, indicando que o uso de sementes infetadas também teve como consequência o aparecimento de sintomas nas folhas primárias numa mesma proporção em todas as metodologias empregadas.

No presente estudo, verificou-se que, mesmo com o plantio de sementes 100% infetadas, não houve transmissão do patógeno para todas as plântulas, independentemente da metodologia. O maior índice de plântulas não infetadas foi verificado no método ágar-água, seguido pelos métodos solo seco, solo encharcado e papel de filtro. Verificou-se, também, o surgimento de plântulas sadias que resultou do plantio de sementes reconhecidamente infetadas por *P. grisea*, estatisticamente igual para todos os tratamentos.

Os resultados do presente trabalho sugerem que *P. grisea* pode ser transmitida de sementes para plântulas, e que, portanto, a brusone de triticales pode ter sido introduzida na região sul do estado de São Paulo, por meio de sementes contaminadas oriundas do Paraná, onde essa doença já havia sido constatada (Mehta & Baier, 1998). Muitas pesquisas já demonstraram, e existe um consenso quanto à presença de *P. grisea* em sementes de arroz (Lamey, 1970; Cornélio *et al.*, 2000) e também de trigo (Goulart *et al.*, 1995; Reis *et al.*, 1995). Entretanto, há uma aparente contradição entre aqueles que afirmaram que sementes podem transportar o patógeno para áreas ainda não infetadas (Ranganathaiah *et al.*, 1979; Goulart & Paiva, 1993; Long *et al.*, 2001) e aqueles que mostraram que a transmissão do fungo para plântulas era muito baixa (Lamey, 1970; Chung & Lee, 1983; Goulart & Paiva, 1991; Manandhar *et al.*, 1998).

O presente trabalho demonstrou que essa contradição deveu-se aos efeitos do plantio de sementes com níveis de inóculo distintos, podendo a transmissão do fungo resultar na morte de plântula ou em sintomas nas folhas primárias sem, no entanto, causar morte de plântulas. No primeiro caso, as raízes de plântulas recém liberadas das sementes se mostraram descoloridas, com abundante crescimento micelial do patógeno e morte nos primeiros dias após o plantio. Seu efeito pode ser observado no campo através da falha no stand de formação da lavoura e está de acordo com a baixa germinação das sementes reportadas anteriormente por Pande *et al.* (1994). A baixa taxa de transmissão do patógeno para a parte aérea, especialmente nos métodos de ágar-água, solo encharcado e solo seco, também foi observada nos estudos de Lamey (1970), Chung & Lee (1983), Goulart & Paiva (1991), Manandhar *et al.* (1998).

Quando analisado como um todo, o presente trabalho mostrou a importância de sementes como fonte primária dessa doença e reforça a importância do tratamento de sementes como uma das estratégias de controle já enfatizada por outros pesquisadores (Goulart & Paiva, 1991; Pande *et al.*, 1994).

Para se atingir este objetivo utilizou-se de um artifício ainda não empregado anteriormente, qual seja, a utilização de sementes pré-germinadas e 100% infetadas por *P. grisea*. Esta estratégia e a realização do estudo em condições controladas eliminaram o uso de amostras com grande número de sementes, de porcentagens variadas e as muitas variáveis que envolvem estudos de campo.

Cada um dos métodos utilizados apresentou características próprias. O método ágar-água, utilizado em sementes de arroz por Chung & Lee (1983) e Pande *et al.* (1994) permitiu o acompanhamento do desenvolvimento de lesões tanto da parte aérea como do sistema radicular. Foi de fácil manuseio, sendo uma técnica "limpa", visto que não envolveu o manuseio de solo, e permitiu uma esporulação abundante do fungo nos tecidos afetados. As plantas se desenvolveram normalmente nesse meio até o último dia da avaliação.

O método de solo seco foi o que melhor simulou a situação real de plantio no campo, especialmente de arroz de sequeiro, trigo e triticales. Os dados obtidos no presente estudo concordaram com outros estudos que mostraram baixa transmissão do patógeno das sementes para as plântulas (Goulart & Paiva, 1991; Goulart & Paiva, 1993). Os estudos desses autores, no entanto, não abordaram a porcentagem de morte de plântulas devido ao fungo, possivelmente devido à óbvia dificuldade de se realizar tal tarefa em condições de campo, além disso, esse método permitiu o acompanhamento da lesão somente na parte aérea.

A taxa de transmissão do patógeno no método de solo encharcado foi alta, contrariando a observação de Manandhar *et al.* (1998), na qual a alta umidade do solo reduziu a taxa de transmissão em arroz. A discrepância entre esses resultados pode estar no efeito que a umidade no solo exerce sobre os hospedeiros. O arroz é uma cultura adaptada às condições de solo encharcado, não sofrendo nenhum estresse em relação a essa situação, diferentemente de triticales. No presente estudo,

a alta umidade do solo, possivelmente, proporcionou as condições favoráveis à ação do fungo que acarretou na maior taxa de morte de plântulas (47,5%).

O emprego do método adaptado do papel de filtro permitiu que o fungo crescesse mais rapidamente, ocasionando maior número de plântulas mortas na avaliação aos seis dias. Esse método ainda não havia sido empregado em estudos de transmissão, mas apresentou uma grande vantagem, facilitando a recuperação do patógeno por deixar a superfície da semente e da plântula expostas a visualização. Essa característica e o fato da taxa de transmissão ter sido a maior, não diferindo dos outros métodos, permite recomendá-lo para estudos de laboratório onde seja necessário o acompanhamento da evolução do patógeno nos tecidos.

Outro fato interessante a ser salientado no presente estudo é que, mesmo com o plantio de sementes comprovadamente infetadas com *P. grisea*, isso nem sempre resultou em efeito deletério para plântulas (Tabela 1). A porcentagem de plântulas sadias, mesmo com todas as condições aparentemente favoráveis para o desenvolvimento do fungo, atingiu 35% no método ágar-água. Esse fenômeno ocorrido em todas as metodologias empregadas, também foi observado por outros investigadores em arroz (Lamey, 1970; Chung & Lee, 1983; Goulart & Paiva, 1991; Goulart & Paiva 1993) embora não se possa precisar se foi devido ao período latente (Manandhar *et al.*, 1998) ou devido às características morfológicas da semente (Chung & Lee, 1983) ou ainda a outros fatores ainda não investigados.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHUNG, H.S. & LEE, C.U. Detection and transmission of *Pyricularia oryzae* in germinating rice seed. *Seed Science Technology* 11:625-637.1983.
- CORNÉLIO, V.M.O., SANTOS, P.G., SOARES, A.A. & LOPES, T.L.V. Associação entre incidência de brusone e a presença de *Pyricularia grisea* nas sementes de arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35:639-645.2000.
- FAIAD, M.G.R., MACHADO, J.V., VIEIRA, M.G.G.C. & CORNÉLIO, V.M.O. Efeitos e transmissibilidade de *Pyricularia oryzae* Cav. Em sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) sob condições controladas. *Revista Brasileira de Sementes* 16: 45-49. 1994.
- GOULART, A.C.P. & PAIVA, F.A. Controle de *Pyricularia oryzae* e *Helminthosporium sativum* pelo tratamento de sementes de trigo com fungicidas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 26:1983-1988. 1991.
- GOULART, A.C.P. & PAIVA, F.A. Eficiência do tratamento químico de sementes de trigo no controle de *Helminthosporium sativum* e *Pyricularia oryzae*. *Summa Phytopathologica* 19:199-202. 1993.
- GOULART, A.C.P., PAIVA, F.A. & ANDRADE, P.J.M. Relação entre a incidência da brusone em espigas de trigo e a presença de *Pyricularia grisea* nas sementes colhidas. *Fitopatologia Brasileira* 20:184-189. 1995.
- IGARASHI, S, UTIAMADA, C.M., IGARASHI, L.C., KAZUMA, A.H.. & LOPES, R.S. *Pyricularia* em trigo. 1. Ocorrência de *Pyricularia* sp. no estado do Paraná. *Fitopatologia Brasileira* 11:351-52. 1086.
- LAMEY, H.A. *Pyricularia oryzae* on rice seed in the United States. *Plant Dis. Rep.* 54:931-935. 1970.
- LONG, D.H., CORREL, J.C., LEE, F.N. & TEBEEST, D.O. Rice blast epidemics initiated by infested rice grain on the soil surface. *Plant Disease* 85:612-616. 2001.
- MANANDHAR, H.K., LYNDS JORGENSEN, H.J., SMERDEGAARD-PETERSE, V. & MATHUR, S.B. Seedborne infection of rice by *Pyricularia oryzae* and its transmission to seedlings. *Plant Disease* 82:1093-1099. 1998.
- MEHTA, Y.R. & BAIER, A. Variação patogênica entre isolados de *Magnaporthe grisea* atacando triticales e trigo no estado do Paraná. *Summa Phytopathologica* 24:119-125. 1998.
- OU, S.H. Blast. Pages 109-201 in: *Rice diseases*. Ou, S.H. 2<sup>nd</sup> ed. CAB International, Wallingford, UK. 1985.
- PANDE, S., MUKURU, S.Z., ODHIAMBO, R.O. & KARUNAKAR, R.I. Seedborne infection of *Eleusine coracana* by *Bipolaris nodulosa* and *Pyricularia grisea* in Uganda and Kenya. *Plant Disease* 78:60-63. 1994.
- RANGANATHAIAH, K.G. SRINIVASAIAH, S.M. & SANNE GOWDA, S. Seed-borne infection of rice by *Pyricularia oryzae* in Karnataka. *Current Science* 48:952-953. 1979.
- REIS, E.M., BLUM, M.C. & FORCELINI, C.A. Sobrevivência de *Pyricularia oryzae*, associada a sementes de trigo. *Summa Phytopathologica* 21:43-44. 1995.