

Efeito de Substratos sobre a Germinação de Uredosporos e Comprimento de Tubos Germinativos de *Puccinia triticina*

Erlei M. Reis & Rudinei L. Richter

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, CEP 99001-970, Passo Fundo, RS, e-mail: erlereis@tpo.com.br

Autor para correspondência: Erlei Melo Reis

REIS, E.M. & RICHTER, R.L. Efeito de substratos sobre a germinação de uredosporos e comprimento de tubos germinativos de *Puccinia triticina*. Fitopatologia Brasileira 32:075-078. 2007.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo testar alguns substratos para elevar a taxa de germinação de uredosporos e promover um maior crescimento dos tubos germinativos do agente causal da ferrugem da folha do trigo (*Puccinia triticina*) e compará-los ao substrato água-ágar considerado padrão. Foram testados os substratos: água-ágar, batata sacarose ágar (BSA), 1/4 BSA, dextrose-ágar, frutose-ágar, manitol-ágar, sacarose-ágar, infusão de folhas de trigo-ágar e extrato de folhas de trigo-ágar. Após a deposição dos uredosporos nas placas de petri contendo os substratos, o material foi incubado em câmara de crescimento, no escuro a 20 °C, por 6, 12 e 24 horas. Avaliou-se a germinação dos uredosporos e mediu-se o comprimento dos tubos germinativos. As médias de germinação e de comprimento dos tubos germinativos foram comparadas pelo teste de Duncan a 5%. Os valores mais elevados de germinação de uredosporos e do comprimento do tubo germinativo foram observados nos substratos infusão de folhas de trigo-ágar e extrato de folhas de trigo-ágar.

Palavras-chave adicionais: ferrugem da folha, *Triticum aestivum*.

ABSTRACT

Effect of substrata on germination of urediniospores and on length of germ tube of *Puccinia triticina*

The objective of this study was to test a methodology which provides a better germination rate of urediniospores and higher growth of germ tubes of the causal agent of wheat leaf rust (*Puccinia triticina*) in relation to the water-agar substratum. The following substrata were tested: water-agar, potato-sucrose-agar (PSA), 1/4 PSA, dextrose-agar, fructose-agar, manitol-agar, sucrose-agar, wheat-leaves infusion-agar and, wheat-leaves extract-agar. A urediniospore suspension was poured on the substrata in Petri dishes and incubated in growth room, in darkness at 20 °C, for 6, 12 and, 24 hours. Germination of urediniospores and length of the germ tube were assessed. Means for germination and germ tube length were compared by Duncan test at 5%. The highest germination rate and germ tube growth were observed on the wheat-leaves infusion and wheat-leaves extract-agar substrata.

Additional keywords: leaf rust, *Triticum aestivum*.

INTRODUÇÃO

A cultura do trigo se constitui na melhor alternativa econômica para cultivo de inverno no sul do Brasil (Anônimo, 2003). O sistema de produção de trigo exige um alto grau de tecnificação para garantir produtividade e qualidade da produção que possibilitem resultado econômico ao produtor e competitividade vantajosa num mercado cada vez mais globalizado. Há, contudo, dificuldades quanto à produção de cereais de inverno, as quais se devem a ocorrência de doenças que estão relacionadas com as adversidades climáticas ocorrentes no sul do Brasil. As chuvas frequentes durante o espigamento, aliada à temperatura alta, contribuindo para o ataque severo de doenças, constitui-se na principal causa da instabilidade das safras (Reis *et al.*, 2001).

Dentre as doenças do trigo destaca-se a ferrugem da folha causada pelo fungo *Puccinia triticina* Ericks. (Samborski, 1985).

As principais estratégias de controle da ferrugem da folha do trigo concentram-se no desenvolvimento

de cultivares com resistência genética e na aplicação de fungicidas nos órgãos aéreos quando a intensidade da doença atingir o limiar de ação. Segundo Barcellos *et al.* (1997), apesar dos esforços da pesquisa, a resistência à ferrugem da folha não é durável, e por isso, frequentemente os cultivares cultivados como resistentes tem os mecanismos de defesa vencidos pelas novas raças virulentas de *P. triticina*.

Na safra 2002 foi observado na região dos Campos Gerais do Paraná, que um fungicida do grupo dos triazóis não controlou satisfatoriamente a ferrugem da folha. Esse fato foi observado no cultivar trigo OR-1 tendo-se levantado a hipótese de que poderia ter surgido uma nova raça do fungo com insensibilidade ao princípio ativo daquele fungicida.

Uma das maneiras de se avaliar a sensibilidade de um fungo a substâncias químicas é através de experimentos conduzidos em laboratório com substrato artificial, onde se quantifica o comportamento da germinação dos esporos ou o crescimento do micélio sobre substratos suplementados com concentrações crescentes de princípios ativos de fungicidas. Um substrato comumente utilizado é o meio

ágar-água (Torgeson, 1967). Porém, neste substrato a taxa de germinação de urediniosporos das ferrugens é reduzida, provavelmente por serem parasitas biotróficos. Baseado no relatado de Suzuki *et al.* (1998), levantou-se a hipótese que exsudatos foliares do trigo pudessem estimular a germinação de uredosporos “*in vitro*”.

Este trabalho teve por objetivo identificar um substrato que proporcione melhor taxa de germinação de uredosporos e promova um maior crescimento dos tubos germinativos dos esporos de *P. triticina* em relação ao substrato padrão ágar-água.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de Fitopatologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo. Foram utilizados nove substratos: ágar-água (12 g de ágar/litro de água), batata-sacarose-ágar (200 g de batata, 20 g de sacarose e 12 g de ágar/litro de água), batata-sacarose-ágar (1/4), sacarose-ágar (12 g de ágar; 11,88 g de sacarose em 1 litro de água), frutose-ágar (12 g de ágar; 12,5 g de frutose em 1 litro de água), dextrose-ágar (12 g de ágar; 12,5 g de dextrose por litro de água), manitol-ágar (12 g de ágar; 12,64 g de manitol por litro de água), infusão de folhas de trigo ágar (12 g de ágar, 1g de folhas de trigo por litro de água) e extrato de folhas de trigo ágar (12 g de ágar, 1g de folhas de trigo por litro de água). Foram utilizadas igualmente para todos os substratos 5 g de carbono por litro para cada fonte. A unidade experimental foi constituída de uma placa de petri. Foram utilizadas quatro repetições para cada tratamento.

Os uredosporos, coletados nas uredopústulas de folhas de trigo naturalmente infectadas, foram suspensos e diluídos em água para obtenção de uma concentração conhecida (aproximadamente 500 uredosporos/placa) e vertido 1 mL da suspensão sobre os substratos. As placas foram incubadas em câmaras de crescimento, à temperatura de 20°C, no escuro, por períodos de 6, 12 e 24 h.

A germinação dos uredosporos foi avaliada em microscópio óptico pela varredura da placa, se examinado 50 uredosporos por repetição. Considerou-se como germinado o uredosporo que apresentou o tubo germinativo mais longo do que o seu maior diâmetro (Sharvelle, 1969). O comprimento do tubo germinativo foi mensurado com um micrômetro adaptado a ocular do microscópio.

Os experimentos foram repetidos duas vezes. Na análise estatística os dados foram transformados em (\sqrt{x}), por não apresentarem distribuição normal, decorrente do aparecimento de porcentagens próximas a zero em dois tratamentos. Os dados foram analisados seguindo o modelo experimental fatorial num arranjo de tratamentos completamente casualizados sendo submetidos ao teste de comparação de médias (Duncan a 5%).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados da análise de variância, houve interação significativa entre substratos e tempo de exposição, tanto para taxa de germinação de uredosporos como para o comprimento do tubo germinativo. Nesse sentido, para o tempo de exposição de 6 h o substrato que apresentou a maior taxa de germinação de uredosporos, foi o extrato de folhas de trigo-ágar (63,61% de germinação), porém não diferenciou significativamente dos tratamentos dextrose-ágar, sacarose-ágar, batata-sacarose-ágar e batata-sacarose-ágar (1/4) (Tabela 1). A menor taxa de germinação para o tempo de exposição de 6 h foi obtida no substrato manitol-ágar (1% de germinação), não diferindo significativamente do substrato frutose-ágar. Já no tempo de exposição de 12 h, o substrato que obteve a melhor taxa de germinação foi a infusão de folhas de trigo-ágar (61,35% de germinação), não diferenciando significativamente dos substratos extrato de folhas de trigo-ágar, dextrose-ágar, sacarose-ágar, batata-sacarose-ágar (1/4) e água-ágar (Tabela 1). A menor porcentagem absoluta de germinação para o tempo de exposição de 12 h foi obtida no substrato

TABELA 1 - Efeito de substratos e do tempo de exposição na germinação (%) de uredosporos de *Puccinia triticina*

Substratos	Tempo de exposição (h)			Média
	6	12	24	
1- Água-ágar	37,50 Ac	49,50 Aab	43,89 Aab	43,63
2- Batata-sacarose-ágar (1/4)	50,45 Aabc	54,90 Aab	49,29 Aa	51,55
3- Batata-sacarose-ágar	47,50 Aabc	42,05 Ab	41,64 Aab	43,73
4- Sacarose-ágar	48,06 Aabc	49,35 Aab	44,82 Aab	47,41
5- Dextrose-ágar	56,00 Aab	50,63 Aab	46,64 Aab	51,09
6- Frutose-ágar	2,00 Bd	42,55 Ab	33,32 Ab	25,96
7- Manitol-ágar	1,00 Cd	29,56 Bc	49,64 Aa	26,73
8- Infusão de folhas de trigo-ágar	44,60 Bbc	61,35 Aa	55,71 ABa	53,89
9- Extrato de folhas de trigo-ágar	63,61 Aa	53,67 Aab	48,18 Aa	55,15
Média	38,97	48,17	45,90	44,35

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste Duncan a 5%.

manitol-ágar com 29,56% de germinação. No tempo de exposição de 24 h, o substrato infusão de folhas de trigo-ágar proporcionou a melhor taxa de germinação (55,71% de germinação), não diferindo significativamente dos demais substratos, com exceção do substrato frutose-ágar. A menor taxa de germinação ocorrida no tempo de exposição de 24 h foi no substrato frutose-ágar com 33,32% de germinação, não diferindo significativamente dos substratos água-ágar, batata-sacarose-ágar, sacarose-ágar e dextrose-ágar.

Os tratamentos não apresentaram diferenças significativas quanto à porcentagem de uredosporos germinados devido a variação no tempo de exposição, com exceção dos tratamentos frutose-ágar e infusão de folhas de trigo-ágar, os quais apresentaram a maior germinação de uredosporos em ambos os casos, com 12 e 24 h de exposição. O substrato manitol-ágar proporcionou a maior taxa de germinação no tempo de exposição de 24 h.

A máxima germinação detectada ocorreu no substrato extrato de folhas de trigo-ágar com 63,61% com 6 h de exposição. Esse número ainda pode ser considerado baixo e, portanto, outros substratos e condições ambientais devem ser pesquisados para melhorar ainda mais a taxa de germinação. Por outro lado, a menor germinação foi detectada no substrato manitol-ágar com 1% de viabilidade com apenas 6 h de exposição, não diferindo significativamente do substrato frutose-ágar com 6 h de exposição.

O substrato manitol-ágar foi o único que respondeu positiva e significativamente ao aumento do tempo de exposição ao incrementar a germinação em função desta variável. Com 6 h houve uma germinação de 1,0%, 12 h germinação de 29,6 % e 24 h germinação de 49,6%. No entanto, em trabalhos de pesquisa o desejável é obter a máxima germinação com o menor tempo de exposição. Nesse sentido o melhor substrato foi o extrato de folhas de trigo-ágar (Tabela 1).

Quanto ao efeito dos substratos no crescimento dos tubos germinativos, observa-se que o maior crescimento

do tubo germinativo ocorreu com a utilização do substrato extrato de folhas de trigo-ágar (38,7 μm de comprimento) com tempo de exposição de 6 h, não diferenciando significativamente do substrato infusão de folhas de trigo-ágar (Tabela 2). O menor comprimento do tubo germinativo observado no tempo de exposição de 6 h ocorreu no substrato manitol-ágar, não diferindo significativamente do substrato frutose-ágar. No tempo de exposição de 12 h, observou-se que o maior comprimento do pró-micélio foi proporcionado pelo substrato infusão de folhas de trigo-ágar (53,5 μm de comprimento), não sendo sobrepujado por nenhum dos demais substratos no mesmo tempo de exposição. O menor comprimento do pró-micélio para o tempo de exposição de 12 h foi observado no substrato frutose-ágar, não diferindo significativamente dos substratos, manitol-ágar, água-ágar e sacarose-ágar. No tempo de exposição de 24 h, o substrato que proporcionou o maior comprimento do tubo germinativo foi a infusão de folhas de trigo-ágar (52,0 μm de comprimento), não diferindo significativamente do substrato extrato de folhas de trigo-ágar. No substrato frutose-ágar observou-se o menor comprimento absoluto do tubo germinativo para o tempo de exposição de 24 h.

Para a variável tempo de exposição observou-se que o substrato batata-sacarose-ágar (1/4), proporcionou o maior comprimento do tubo germinativo no tempo de exposição de 12 h. Nos substratos frutose-ágar e infusão de folhas de trigo-ágar, o maior comprimento do tubo germinativo observado em ambos os casos foi nos tempos de exposição de 12 e 24 h. Já para os substratos manitol-ágar e extrato de folhas de trigo-ágar, o maior comprimento do tubo germinativo observou-se em 24 h de exposição. Nos demais substratos água-ágar, batata-sacarose-ágar, sacarose-ágar e dextrose-ágar, não se observou diferenças significativas no comprimento do pró-micélio nos tempos de exposição testados.

O menor comprimento do tubo germinativo

TABELA 2 - Efeito de substratos e do tempo de exposição no comprimento do tubo germinativo (μm) de uredosporos de *Puccinia triticina*

Substratos	Tempo de exposição (h)			Média
	6	12	24	
1- Água-ágar	10,82 Ad	14,68 Aef	16,47 Ac	13,99
2- Batata-sacarose-ágar (1/4)	16,79 Bbc	28,52 Ac	20,29 Bbc	21,87
3- Batata-sacarose-ágar	22,07 Ab	26,07 Acd	25,85 Ab	24,66
4- Sacarose-ágar	17,69 Abc	15,97 Aef	22,22 Abc	18,63
5- Dextrose-ágar	14,52 Acd	20,63 Ade	17,26 Ac	17,47
6- Frutose-ágar	2,98 Be	11,99 Af	9,60 Ad	8,19
7- Manitol-ágar	1,17 Ce	13,17 Bf	18,57 Ac	10,97
8- Infusão de folhas de trigo-ágar	34,83 Ba	53,48 Aa	52,03 Aa	46,78
9 Extrato de folhas de trigo-ágar	38,69 Ba	40,80 Bb	50,77 Aa	43,42
Média	17,73	25,03	25,90	22,9

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste Duncan a 5%.

foi observado no substrato manitol-ágar no tempo de exposição de 6 h (1,2 µm de comprimento), não diferindo significativamente do substrato frutose-ágar no tempo de exposição de 6 h.

Folhas de trigo, possivelmente, devem liberar compostos químicos solúveis em água capazes de induzir a germinação de uredosporos e estimular um maior crescimento do tubo germinativo, principalmente de fungos biotróficos. Fato semelhante foi relatado para *Puccinia psidii* Winter por Susuki *et al.* (1998) e Susuki & Silveira (2003).

Embora se trate de um parasita biotrófico, houve resposta do substrato sobre o crescimento dos tubos germinativos indicando haver absorção e aproveitamento dos nutrientes disponíveis de modo a promover crescimento do tubo germinativo. Portanto, os substratos infusão de folhas ou extrato foliar, podem ser utilizados nos testes de sensibilidade de *P. triticina* a fungicidas em condições *in vitro*. Com esse procedimento, pode-se determinar a DE₅₀ (concentração inibitória de 50% da germinação de esporos ou do comprimento micelial) de fungicidas a *P. triticina* e monitorar sua variabilidade em função da sensibilidade à substâncias químicas em função do tempo de exposição.

Os resultados obtidos permitem concluir que os substratos extrato de folhas de trigo-ágar e infusão de folhas de trigo-ágar promoveram o crescimento do tubo germinativo de *P. triticina* de maneira superior ao substrato padrão água-ágar e com um tempo de exposição de 12 hs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANONIMO. Reunião da Comissão Sul Brasileira de Pesquisa de Trigo. Indicações técnicas da comissão sul-brasileira de pesquisa de trigo. Passo Fundo, RS. Embrapa Trigo. 2003.
- BARCELLOS, A.L., MORAES-FERNANDES, M.I.B. & ROELFS, A.P. Ferrugem da folha do trigo (*Puccinia recondita*): durabilidade da resistência. Summa Phytopathologica 23:101-117. 1997.
- REIS, E.M., CASA, R.T. & MEDEIROS, C.A. Diagnose, patometria e controle de doenças de cereais de inverno. Londrina. ES Comunicação S/C Ltda. 2001.
- SAMBORSKI, D.J. Wheat leaf rust. In: Roelfs, A.P. & Bushnell, W.R. (Eds.) The cereal rusts: Disease, distribution, epidemiology, and control. Orlando FL. Academic Press 2v. 1985. pp. 39-59.
- SHARVELLE, E.G. Chemical control of plant diseases. Fort Worth. Prestigie Press. 1969.
- SUZUKI, M.S., SILVEIRA, S.F. & ALFENAS, A.C. Germinação de uredíniosporos de *Puccinia psidii* Wint. em meio de ágar com extratos foliares de goiaba, jambo ou eucalipto. Fitopatologia Brasileira 23:285. 1998. (Resumo)
- SUZUKI, M.S. & SILVEIRA, S.F. Germinação *in vitro* de uredíniosporos de *Puccinia psidii* armazenados sob diferentes combinações de umidade relativa e temperatura. Summa Phytopathologica 29:188-192. 2003.
- TORGESON, D.C. Determination and measurement of fungitoxicity. In: Fungicides. An advanced treatise. New York NY. Academic Press. pp. 93-123. 1967.

Recebido 21 Novembro 2005 - Aceito 12 Dezembro 2006 - FB 5114