

Indução da germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes substratos

Induction of carpogenic germination of sclerotia of Sclerotinia sclerotiorum under different substrates

Erlei Melo Reis¹, Ricardo Trezzi Casa^{2*}, Fernando Gava³,
Éder Novaes Moreira⁴, Cristiano Sachs⁵

Recebido em 21/12/09; aprovado em 17/06/2011.

RESUMO

O mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum* é uma das doenças mais destrutivas da soja na região sul do Brasil. O patógeno pode sobreviver no solo como estruturas de repouso do tipo escleródios. Este trabalho teve como objetivo identificar substratos para indução da germinação carpogênica dos escleródios e a sua viabilidade. Foram coletados escleródios naturalmente produzidos em plantas infectadas provenientes de uma lavoura de soja do município de Coxilha, RS. Foram selecionados 500 escleródios para condução do experimento com tamanho entre 5 e 7 mm de comprimento e diâmetro aproximado de 3 mm. A germinação carpogênica dos escleródios foi determinada em laboratório cultivando-os sobre cinco substratos: areia grossa esterilizada, vermiculita, ágar-água a 1%, ágar-água a 1% + sulfato de estreptomicina e água esterilizada. A avaliação da viabilidade foi feita de dez em dez dias, contando-se o número de escleródios com a presença de apotécios até 120 dias. Ágar-água, areia e vermiculita promoveram maior velocidade e percentual final de germinação carpogênica, sendo que aos 40 dias, 50% dos escleródios germinaram. Menor e mais lenta germinação

ocorreu com água esterilizada e ágar-água + sulfato de estreptomicina.

PALAVRAS-CHAVE: estrutura de repouso, mofo branco, sobrevivência.

SUMMARY

White mold caused by *Sclerotinia sclerotiorum* is one of the most destructive diseases of soybean crop in Southern Brazil. The pathogen can survive in the soil through its resting structures, the sclerotia. This work aimed to identify substrates for induction of carpogenic germination of sclerotia and their viability. Sclerotia used throughout this work were naturally produced in infected soybean plants on a commercial farm in Coxilha county, RS. Sclerotia were separated manually and then those with five to seven mm of length and approximately three millimeters of diameter were selected. The carpogenic germination was determined in the laboratory by growing the sclerotia on five substrates: sterilized coarse sand, vermiculite, water - agar 1%, water - agar 1% + streptomycin sulphate and sterile water. The evaluation of the sclerotia viability was performed at 10 day intervals, counting those with formed

¹ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, Brasil.

² Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/ UDESC). Av. Luiz de Camões, 2090, Bairro Conta Dinheiro, CEP 88520-000, Lages, SC, Brasil. Email: a2rtc@cav. udesc.br. *Autor para correspondência.

³ BASF, Londrina, PR, Brasil.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil.

⁵ Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, CAV/UDESC, Lages, SC, Brasil.

apothecia up to 120 days. Water-agar, coarse sand and vermiculite promoted higher speed and final percentage of carpogenic germination of esclerotia, resulting in 50% of germination in 40 days. Lower speed and slower germination occurred with sterile water and water + streptomycin-sulphate.

KEY WORDS: resting structures, white mold, survival.

INTRODUÇÃO

O mofo branco ou podridão branca da haste causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é uma das doenças mais destrutivas da soja, notadamente em locais com alta umidade no solo e temperaturas amenas (GRAU e HARTMAN, 1999). Este fungo pode atacar mais de 400 hospedeiros, dentre eles vários de importância agrícola, como soja, feijão, girassol, amendoim, ervilha, algodão e tomate, tornando difícil seu controle através da rotação de culturas (PAULA JUNIOR et al., 2006). O controle químico como medida isolada também não tem obtido sucesso, fazendo-se necessário o emprego de outros métodos conjuntamente para alcançar resultados satisfatórios que possibilitem manejar esta doença.

No sul do Brasil, nas regiões de Planalto, Campos de Cima da Serra e Campos Gerais, o mofo-branco é frequente, principalmente em áreas de monocultura, em lavouras com alta população de plantas e em cultivares de ciclo tardio. Os primeiros sintomas surgem nas hastes, logo após o florescimento da planta, como manchas aquosas que evoluem para coloração castanho-clara e logo desenvolvem abundante formação de micélio branco e denso. No tecido infectado o fungo produz os esclerócios (estruturas de repouso), negros, duros e de formato irregular (GRAU e HARTMAN, 1999; HENNING et al., 2005). Durante o processo de maturação das plantas e na operação de colheita da oleaginosa, os escleródios podem cair e permanecer sobre a superfície do solo ou serem colhidos com a semente (ALMEIDA et al., 2005). Os escleródios colhidos podem ser

disseminados a longas distâncias acompanhando a semente. No campo, os escleródios podem permanecer viáveis até terem acesso ao substrato preferencial. Nos Estados Unidos há relato de que os escleródios podem se manter viáveis no solo por até oito anos (ADAMS e AYERS, 1979), entretanto, no sul do Brasil devido a condições climáticas diferenciadas, a viabilidade destes foi de aproximadamente 14 meses em sistema de semeadura direta e de 36 meses em semeadura convencional (REIS e TOMAZINI, 2005).

A germinação dos escleródios de *S. sclerotiorum* pode ser miceliogênica (produzindo micélio) ou carpogênica (com a produção de apotécios). A produção de escleródios pode ocorrer na natureza ou em condições controladas sob meios de cultura (FERRAZ e CAFÉ-FILHO, 1998). Nos apotécios são produzidas ascas que liberam e ejetam no ar os ascosporos do fungo, que são disseminados pelo vento até os sítios de infecção (GRAU e HARTMAN, 1999).

Trabalhos visando inibição da germinação carpogênica no controle do mofo-branco em diferentes culturas têm sido conduzidos através do controle químico (MORTON e HALL, 1989; VIEIRA et al., 2001; VIEIRA et al., 2003), do manejo da umidade e temperatura do solo (BOLAND e HALL, 1987; NASSER et al., 1994; DILLARD et al., 1995; NAPOLEÃO et al., 2005; NAPOLEÃO et al., 2007), da luminosidade (BLUM et al., 2002), de agentes biológicos (ETHUR et al., 2005), da solarização (PEREIRA et al., 1996), do espaçamento de plantas (HOES e HUANG, 1985), de herbicidas (HUANG e BLACKSHAW, 1995), de resíduos orgânicos (HUANG et al., 1997) e de substratos naturais (GROGAN e ABAWI, 1975; HONDA e YUNIOKI, 1977).

Os trabalhos citados tiveram como objetivo alcançar sucesso na erradicação ou inibição da germinação de escleródios, porém são escassos estudos sobre substratos que proporcionem condições ideais para indução da germinação carpogênica visando determinar a viabilidade dos esclerócios de *S. sclerotiorum* para formar o apotécio com posterior maturação e liberação dos ascosporos. Ferraz e Café-filho (1998)

determinaram que substratos de incubação como areia, composto orgânico, ágar-água e composto + areia favorecem a formação de apotécios. Blum e Rodrigues (2004), trabalhando com *Sclerotium rolfsii* Sacc. encontraram evidências de que alguns resíduos vegetais como os de mucuna ou casca de pinus, quando adicionados em baixa concentração ao solo (25 g por kg), podem estimular a germinação dos escleródios, mas quando esta concentração aumenta para acima de 100 g por kg de solo, ocorreu a supressividade ao patógeno.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar, sob condições controladas, a germinação carpogênica e a viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum* em diferentes substratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os escleródios de *S. sclerotiorum* foram obtidos em lavoura comercial de soja cultivar CD 214 RR no município de Coxilha, RS, na safra agrícola de 2006/07. A lavoura foi conduzida sob sistema plantio direto e monocultura por três safras consecutivas, com histórico de ocorrência de mofo branco da haste. Na colheita da soja, foram coletados quatro sacos de 25 kg de grãos contendo escleródios do fungo. Os sacos foram levados para o Laboratório de Fitopatologia da Faculdade de Agronomia da Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, onde foi feita a separação manual dos escleródios, obtendo-se aproximadamente 1,0 kg de escleródios. Deste foram selecionados 500 escleródios para condução do experimento, com tamanho entre 5 e 7 mm de comprimento e diâmetro aproximado de 3 mm. De acordo com Ferraz e Café-Filho (1998) escleródios com diâmetros entre 2,4 e 6,3 mm não diferem quanto a capacidade de formar apotécios “in vitro”.

Os escleródios foram desinfestados em solução de hipoclorito de sódio a 2% durante cinco minutos e o excesso do desinfestante foi retirado pela lavagem com água esterilizada. Posteriormente foram mantidos dentro da câmara de fluxo de ar sobre papel filtro durante trinta minutos para secagem.

A germinação carpogênica dos escleródios foi determinada cultivando as estruturas sobre cinco substratos: areia grossa esterilizada (duas autoclavagens com intervalo de 24 horas a temperatura de 120°C durante 30 minutos), vermiculita, ágar-água a 1%, ágar-água a 1% + sulfato de estreptomicina (200 mg L⁻¹) e água esterilizada. Todos os substratos foram acondicionados em caixas de acrílico tipo gerbox de 11 x 11 x 3,5 cm de altura. Foram cultivados 100 escleródios por substrato, sendo 20 escleródios por unidade experimental. O material foi mantido em câmara de crescimento com temperatura de 17°C e fotoperíodo de 12 horas, durante 120 dias.

A avaliação da viabilidade dos escleródios foi feita de dez em dez dias, contando-se o número de escleródios com a presença de apotécio. Os resultados do número de escleródios germinados foram transformados em porcentagem de germinação carpogênica. Os dados foram submetidos à ANOVA apresentando *F* significativo (5%). Os dados quantitativos foram submetidos à análise de regressão entre o tempo de incubação (variável independente) e a porcentagem de germinação carpogênica dos escleródios (variável dependente) para cada substrato testado.

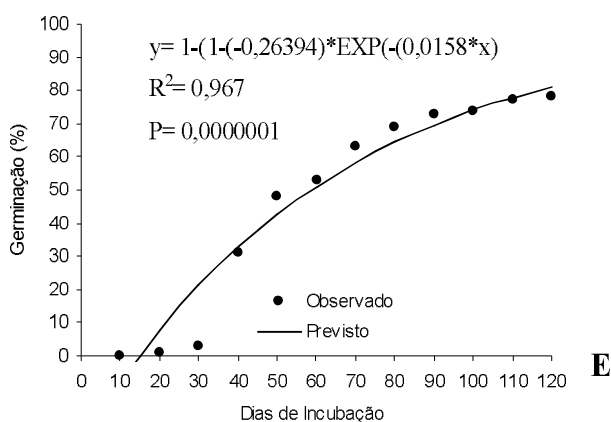
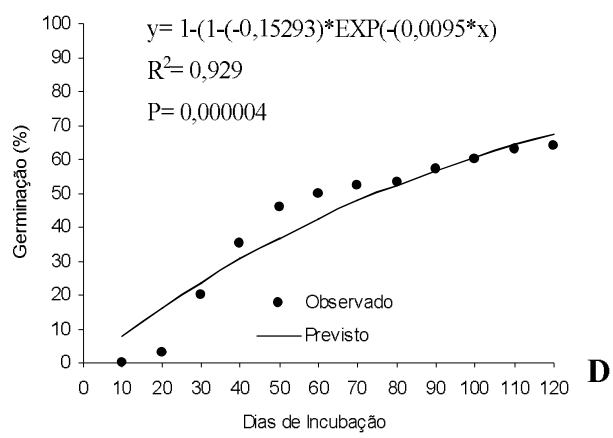
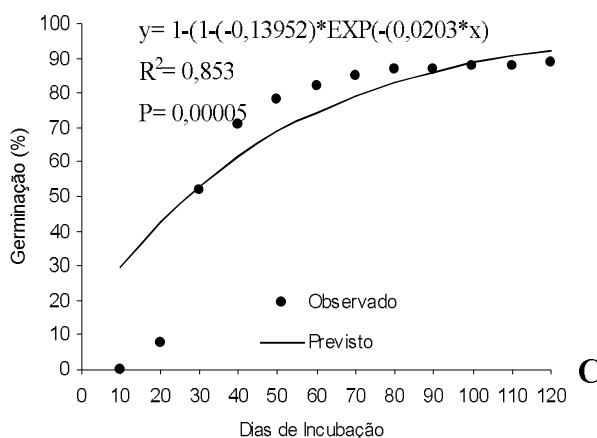
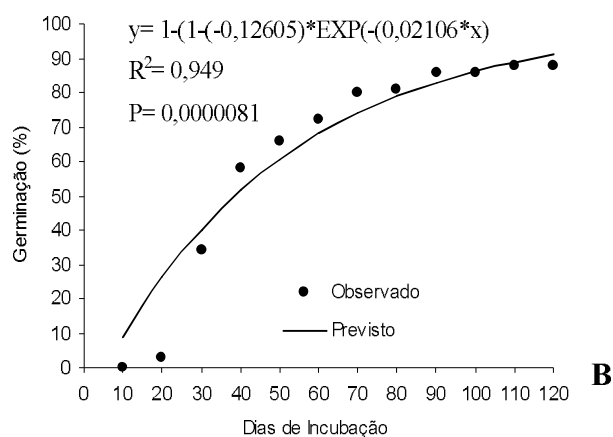
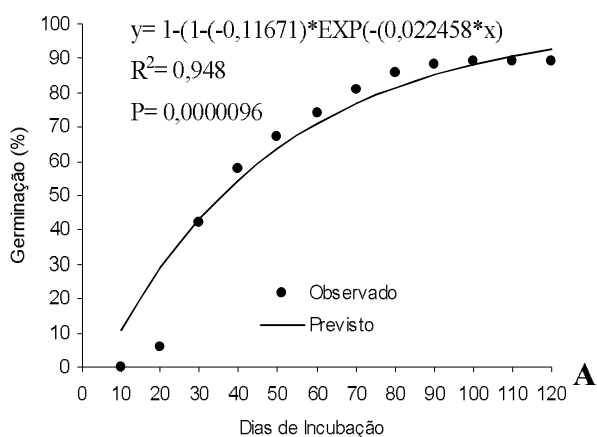
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todos os substratos utilizados ocorreu a germinação dos escleródios em função do tempo, obtendo-se equações exponenciais e significativas para os cinco substratos (Figura 1). Porém, o percentual de escleródios germinados ao final de 120 dias variou entre os substratos. Areia grossa esterilizada, ágar-água e vermiculita obtiveram os melhores resultados em relação à germinação carpogênica dos escleródios, alcançando 89%, 89% e 88%, respectivamente (Figura 1). Água esterilizada e ágar-água + sulfato de estreptomicina apresentaram resultados um pouco inferiores, com valores de 78% e 64%, respectivamente (Figura 1). De acordo com Huang e Kozub (1989) e Ferraz e Café-Filho (1998) a produção de escleródios é maior quando os escleródios são incubados em

substratos inertes, e menor sobre substratos ricos em carboidratos. Segundo Ferraz e Café-Filho (1998), areia, composto orgânico, ágar-água e composto + areia não diferem na formação de apotécios em escleródios incubados até 60 dias, porém neste trabalho os autores não mencionam

a porcentagem de germinação carpogênica.

Para todos os substratos, na medida em que foi transcorrendo o tempo houve um acréscimo constante na germinação dos escleródios até um ponto onde esta começou a se estabilizar, que variou conforme o substrato utilizado.



- A Areia grossa esterilizada
- B Vermiculita
- C Água-Ágar
- D Água-Ágar + Sulfato de estreptomicina
- E Água esterilizada

Figura 1- Relação entre substratos (A, B, C, D, E) e tempo de incubação (dias) sobre a porcentagem de germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. Passo Fundo, RS, 2008.

O tempo necessário para que os escleródios atingissem um percentual superior a 50% de germinação foi menor em meio de ágar-água, necessitando apenas 30 dias, e de 40 dias para areia e vermiculita. Onde foi utilizada apenas água esterilizada e ágar-água + sulfato de estreptomicina, foi necessário o dobro deste tempo. Estes resultados indicam que quando se deseja uma rápida e eficiente germinação dos escleródios deve se dar preferência ao uso de ágar-água, areia e vermiculita. Estes substratos são pobres em teores de carboidratos demonstrando que o teor de umidade mostrou efeito mais marcante do que a própria natureza química.

CONCLUSÕES

Os escleródios tiveram uma germinação superior nos substratos areia grossa estéril, ágar-água e vermiculita.

A germinação dos esclerócios é mais dependente do teor de água do substrato do que sua composição nutricional.

Os substratos ágar-água, areia e vermiculita podem ser utilizados em estudos epidemiológicos sobre a sobrevivência do fungo e aspectos relacionados à fisiologia do parasitismo pela produção e inoculação de ascósporos nas plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, P.B.; AYERS, W.A. Ecology of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, St. Paul, v.69, p.896-899, 1979.
- ALMEIDA, A.M.R. et al. Doenças da soja. In: KIMATI, H. et al. (eds.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Ceres, 2005. v.2. p.569-588.
- BLUM, L.E.B.; RODRIGUEZ-KABANA, R. Efeitos de resíduos orgânicos no solo na germinação de esclerócios, no crescimento micelial e na ocorrência de doenças induzidas por *Sclerotium rolfii*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.66-74, 2004.
- BLUM, L.E.B. et al. Temperatura, luminosidade e meio de cultura afetando a produção de esclerócios de *Sclerotium rolfii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 1, p.27-32, 2002.
- BOLAND, G.J.; HALL, R. Epidemiology of white mold of white bean in Ontario. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.9, p.218-224, 1987.
- DILLARD, H.R. et al. Conditioning sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* for carpogenic germination. **Plant Disease**, St. Paul, v.79, p.411-415, 1995.
- ETHUR, L.Z. et al. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, p.127-133, 2005.
- FERRAZ, C.L.L.; CAFÉ FILHO, A.C. meios de cultura e fatores culturais para produção de escleródios e apotécios de *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, p.364-369, 1998.
- GRAU, C.R.; HARTMAN, G.L. Sclerotinia Stem Rot. In: HARTMAN, G.L. et al. (eds.) **Compendium of soybean diseases**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1999. p. 46-48.
- GROGAN, R.G.; ABAWI, G.S. Influence of water potential on the growth and survival of *Whetzelinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, St. Paul, v.65, p.122-138, 1975.
- HENNING, A.A. et al. **Manual de identificação de doenças da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2005, 72p.
- HOES, J.A.; HUANG, H.C. Effect of between-row and within-row spacings on development of *sclerotinia* wilt and yield of sunflower. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.7, p.98-102, 1985.
- HONDA, Y.; YUNOKI, T. Control of Sclerotinia disease of greenhouse eggplant e cucumber by inhibition of development of apothecia. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v.61, p.1036-1040, 1977.
- HUANG, H.C.; BLACKSHAW, R.E. Influence of herbicides on the carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v.36, p.59-64, 1995.
- HUANG, H.C. et al. Effect of allyl alcohol and

- fermented agricultural wastes on carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* and colonization by *Trichoderma ssp.* **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.19, p.43-46, 1997.
- HUANG, H.C.; KOZUB, G.C. A Simple method for production of apothecia from esclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Protection Bulletin**, Taiwan, v.31, p.333-345, 1989.
- MORTON, J.G.; HALL, R. Factors determining the efficacy of chemical control of white mold in white bean. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.11, p.297-302, 1989.
- NAPOLEÃO, R. et al. Intensidade do mofo branco do feijoeiro em plantio convencional e direto sob diferentes lâminas d'água. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v.30, p.374-379, 2005.
- NAPOLEÃO, R. et al. Efeito da frequência de rega e da umidade do solo sobre a germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, p.80-83, 2007.
- NASSER, L.C.B. et al. Influence of crop residues and soil moisture on *Sclerotinia sclerotiorum* from the Cerrado region in Brasil. In: THE ANNUAL MEETING OF THE CANADIAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY, 1994, Edmonton. **Analls...** Edmonton: Canadian Society of Plant Pathology, 1994. p.60
- PAULA JUNIOR, T.J. et al. **Manejo integrado do mofo branco do feijoeiro**. Viçosa: EPAMIG/CTZM, 2006, 46p. Guia técnico.
- PEREIRA, J.C.R. et al. Controle integrado de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, p.254-260, 1996.
- REIS, E.M.; TOMAZINI, S.L. Viabilidade de esclerócios de *Sclerotinia sclerotiorum* em duas profundidades no solo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.31, p.97-99, 2005.
- VIEIRA, R.F. et al. Fungicidas aplicados via água de irrigação no controle do mofo-branco no feijoeiro e incidência do patógeno na semente. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p.770-773, 2001.
- VIEIRA, R.F. et al. Chemigation with benomil and fluazinam and their fungicidal effects in soil for white mold control on dry beans. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p.245-250, 2003.