

# INFLUÊNCIA DO SOLO E DE SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DE ESCLERÓDIOS NA GERMINAÇÃO CARPOGÊNICA DE *Sclerotinia sclerotiorum*<sup>1</sup>

Gesimária Ribeiro Costa<sup>2</sup> e Jefferson Luis da Silva Costa<sup>3</sup>

## ABSTRACT

INFLUENCE OF SOIL AND SUBSTRATES ON SCLEROTIUM PRODUCTION IN THE CARPOGENIC GERMINATION OF *Sclerotinia sclerotiorum*

In order to select the best substratum for production of sclerotia and a soil for carpogenic germination, two substrata, rice husks and carrots, and two samples of a Dark Red Latosol with contrasting histories – cropped soil with bean under central pivot irrigation, and uncropped soil – were used. Both substrata were efficient for sclerotia production. However, sclerotia produced on rice husks formed larger numbers of apothecia when buried in soil. Soil history affected the carpogenic germination of sclerotia significantly. The uncropped soil showed suppressive characteristics, indicated by a delay in the appearance of the stipes, slow apothecia formation, and smaller number of stipes and apothecia formed, as related to the cropped soil.

KEY WORDS: suppressiveness, conduciveness, *Phaseolus vulgaris*.

## RESUMO

Com objetivo de encontrar um substrato que forneça uma quantidade suficiente de escleródios do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* e um solo que permitia a sua germinação, utilizou-se os substratos arroz em casca e cenoura, para produção de escleródios, e amostras de solo, Latossolo Vermelho-Escuro, com dois históricos de cultivo: um cultivado com feijão sob condições de pivô central e outro não cultivado. Observou-se que ambos substratos foram eficientes para produção dos escleródios, entretanto, os escleródios produzidos em substrato à base de arroz em casca originaram maior número de apotécios quando enterrados nos solos. Houve influência do histórico de solo na germinação carpogênica dos escleródios. O solo não cultivado apresentou características supressivas evidenciadas pelo retardamento do aparecimento de estipes e formação mais lenta dos apotécios, além da redução do número de estipes e apotécios formados, em relação ao solo cultivado.

PALAVRAS-CHAVE: supressividade, conducividade, *Phaseolus vulgaris*.

## INTRODUÇÃO

A cultura do feijoeiro vem sofrendo grandes transformações no seu sistema de cultivo. Na década de 1980, com o advento da irrigação, essa cultura destacou-se como uma nova opção para a safra de inverno (Aidar & Ferreira 1996). Hoje, o feijoeiro comum é cultivado em três safras por ano, em todos os estados da Federação em um expressivo número de estabelecimentos, sob diferentes estratos de propriedade e variados sistemas de produção (Costa & Pinheiro 2005). Entretanto, a incidência e a severidade do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*

(Lib.) de Bary) têm aumentado devido às condições de ambiente serem favoráveis ao desenvolvimento da doença (Vieira 1988).

O fungo *S. sclerotiorum* forma estruturas de resistência chamadas escleródios, que podem sobreviver no solo por vários anos na ausência de hospedeiros ou em condições desfavoráveis para o seu desenvolvimento (Coley-Smith & Cooke 1971). Os escleródios desempenham papel muito importante no ciclo de vida de *S. sclerotiorum*, visto que são precursores dos apotécios, onde são formados os ascósporos que, em condições ideais, podem infectar

1. Parte da dissertação de mestrado da primeira autora, apresentada à Universidade Federal de Goiás e desenvolvida na Embrapa Arroz e Feijão. Trabalho recebido em out./2002 e aceito para publicação em abr./2006 (registro nº 521).

2. Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília. Campus Universitário Darcy Ribeiro. Caixa Postal 4457, CEP 70910-900, Brasília, DF. E-mail: gcosta@unb.br

3. Embrapa Tabuleiros Costeiros / Embrapa Arroz e Feijão. E-mail: jcosta@cpac.embrapa.br

o feijoeiro, principalmente pelas flores. As flores do feijoeiro servem como fonte básica de nutrientes para iniciar as infecções por esporos (Huinter *et al.* 1978).

Vários fatores influenciam a germinação dos escleródios desse fungo, tais como: os nutrientes do substrato no qual o escleródio é formado, a idade dos escleródios, os fatores ambientais como umidade, temperatura, luz, pH do solo, aeração e a profundidade na qual o escleródio se encontra no solo (Willets & Wong 1980, Phillips 1987).

Vários meios de cultura para a produção de escleródios já foram testados, mas poucos desses trabalhos têm relacionado a sua capacidade de formação de apotécios, quando incorporados ao solo. Prasad *et al.* (1988) cultivaram escleródios de *S. sclerotiorum* em meios de ágar com extratos de sementes de coentro, "omum", feijão-rajma e feijão-de-corda, observando maior produção de escleródios no meio contendo feijão-de-corda e, nenhum escleródio, em meio contendo extrato de coentro. Fernandes *et al.* (1993) estudaram meios à base de vegetais, como: cenoura, mandioquinha-salsa, repolho, alface, vagem de feijão e BD (batata-dextrose) misturados ou não com fubá de milho. Estes autores observaram que os melhores meios foram aqueles compostos de repolho e cenoura. Todos os meios contendo fubá promoveram maior produção de escleródios que os seus correspondentes sem fubá.

Meios de cultura à base de aveia, sorgo, feijão, cenoura, batata, cenoura + batata, com adição ou não de fubá, foram estudados por Ferraz & Café Filho (1998) para produção de escleródios e posterior formação de apotécios de *S. sclerotiorum*. Esses autores concluíram que nem todos os meios que favoreceram a formação de escleródios foram bons para produção de apotécios. Escleródios produzidos em meios ricos em carboidratos desfavoreceram a formação posterior de apotécios. Menor número de escleródios foi obtido usando-se o meio de cenoura e, geralmente, os meios sem adição de fubá resultaram em boa produção de apotécios.

Rios *et al.* (1996) estudaram os meios à base de sorgo, arroz, milho, trigo e fubá de milho, para a produção de escleródios de *S. sclerotiorum*, em laboratório. Concluíram que nos meios à base de grãos de sorgo e arroz houve os maiores números de escleródios, seguidos dos meios à base de grãos de milho. Ademais, nos meios à base de grãos de trigo e fubá de milho houve as menores quantidades de escleródios. As maiores produções de escleródios,

em gramas, foram observadas nos meios à base de grãos de sorgo, seguidos dos de arroz e milho.

Patterson & Grogan (1989) também testaram a germinação miceliogênica de escleródios produzidos em diferentes meios de cultura. Eles obtiveram alta germinação de escleródios quando estes foram produzidos em meios contendo batata ou cenoura e, pequena ou nenhuma germinação, quando produzidos em meio contendo aveia, sorgo ou meio de ágar.

O estudo desses fatores, principalmente os relacionados com o solo, é de grande relevância, uma vez que aproximadamente 90% do ciclo de vida de *Sclerotinia* spp. ocorre no solo (Adams & Ayers 1979). A variação na incidência das doenças em certos solos vem sendo estudada há algum tempo, reconhecendo-se, atualmente, o potencial de solos supressivos como alternativa de controle de doenças causadas por fungos que sobrevivem saprofiticamente no solo (Schneider 1982).

O reconhecimento dos solos supressivos estimulou uma nova busca por mecanismos de controle natural de doenças. Isso é de particular importância no manejo de muitos patógenos de solo para os quais os métodos de controle como resistência do hospedeiro ou tratamento químico são inviáveis (Pozzer & Cardoso 1990).

A supressividade de um determinado solo é, geralmente, detectada pela presença de uma menor população de patógenos em relação a um outro solo com características opostas, conhecido por solo conducivo (Hornby 1983). Após a constatação de que um solo apresenta supressividade natural, passa-se a questionar qual é o mecanismo que envolve o fenômeno. É evidente que os fatores físicos e químicos que afetam a microbiologia do solo estão associados a esse fenômeno (Pozzer & Cardoso 1990). Tratamentos que destroem ou reduzem a atividade biológica dos solos, transformando-os em conducivos, evidenciam a importância desta atividade no processo (Pozzer & Cardoso 1990).

Diante da necessidade de produzir escleródios e apotécios em grande quantidade para ensaios em laboratório, casa de vegetação e ensaios de campo, o presente trabalho teve por objetivo estudar o efeito de dois tipos de substrato para a produção de escleródios de *S. sclerotiorum*, bem como o efeito de solo, da classe dos Latossolos Vermelho-Escuro, com dois históricos de cultivo: um cultivado com feijão sob condições de pivô central e outro não cultivado, sobre a germinação carpopênica dos escleródios.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os substratos utilizados foram à base de grãos de arroz em casca e de cenoura picada. Para o substrato de arroz utilizou-se 100 g de arroz em casca e 60 mL de água destilada, e para o substrato de cenoura utilizou-se 100 g de cenoura picada e 20 mL de água destilada. Os substratos foram colocados em erlenmeyers de 250 mL e autoclavados por 20 minutos a 120°C. Após o resfriamento, em câmara de fluxo laminar, dez discos de BDA contendo micélio do fungo, proveniente de um isolado coletado em feijoeiro comum, no município de Unaí-MG, foram transferidos para os erlenmeyers. Para a completa colonização do substrato e formação de escleródios, os erlenmeyers foram incubados em condições de laboratório ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ) por trinta e quinze dias, respectivamente. Após este período, os escleródios formados no substrato de arroz em casca foram secos à temperatura ambiente e separados, manualmente, do substrato de origem. Os escleródios produzidos no substrato à base de cenoura foram separados do substrato de origem através de lavagem em água corrente e secos à temperatura ambiente.

Os solos utilizados são da classe dos Latossolos Vermelho-Escuro, com dois históricos de cultivo: um cultivado com feijão sob condições de pivô central e outro não cultivado. Esse material foi utilizado por 75 dias para estudar a germinação carpogênica dos escleródios. Ambos solos foram coletados na Fazenda Experimental Capivara, sede da Embrapa Arroz e Feijão, em Santo Antônio de Goiás, GO.

Amostras de 300 g de solo foram colocadas em caixas gerbox (11 cm x 11 cm x 3,5 cm). Em seguida, efetuou-se o enterrio de 25 escleródios do fungo à profundidade de aproximadamente 2,0 cm. Após o enterrio, uma lâmina de água de 6,0 mm foi aplicada por caixa e incubou-se as caixas à temperatura de 18°C, sob fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro, por um período de 75 dias.

As avaliações foram efetuadas contando-se o número de estipes e de apotécios formados por caixa gerbox. A primeira avaliação foi efetuada aos trinta dias após o enterrio e as restantes, distanciadas quinze dias entre si até completarem 75 dias de incubação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições, em estrutura fatorial 2x2. Cada caixa gerbox correspondeu a uma repetição. O ensaio foi repetido duas vezes. Para análise estatística os dados foram transformados em  $(x+1)^{1/2}$ . Os dados obtidos foram submetidos à análise

de regressão para verificar se houve efeito do período de incubação dos escleródios nos solos sobre a formação de estipes e apotécios.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os modelos matemáticos ajustados por regressão (Figuras 1 e 2) descreveram satisfatoriamente ( $R^2 > 0,86$ ) a relação entre os dias após a incubação dos escleródios nos solos e a formação de estipes ou apotécios, para ambos substratos e históricos de solo.

Os resultados dessa análise indicaram haver, para a formação de estipes (Figura 1), efeito significativo do período de incubação ( $p < 0,0001$ ) e do substrato ( $p < 0,0130$ ). Todavia, o efeito do histórico do solo utilizado não foi significativo ( $p > 0,1094$ ). Foi observado, também, um efeito significativo do período de incubação ( $p < 0,0001$ ) e dos substratos ( $p < 0,0223$ ) na formação de apotécios (Figura 2). E, novamente, não foi observado efeito significativo ( $p > 0,4190$ ) do histórico do solo utilizado.

Quando se utilizaram escleródios produzidos no substrato à base de arroz em casca, a formação de estipes e apotécios iniciou-se aos 30 e 45 dias após a incubação dos escleródios no solo, respectivamente, em ambos os solos estudados (Figuras 1 e 2). Nos escleródios produzidos em substrato à base de cenoura, a formação das estipes se deu somente aos 45 dias após a incubação, para ambos solos, e a formação dos apotécios iniciou-se aos 45 e 60 dias após a incubação dos escleródios no solo cultivado e não cultivado, respectivamente (Figuras 1 e 2).

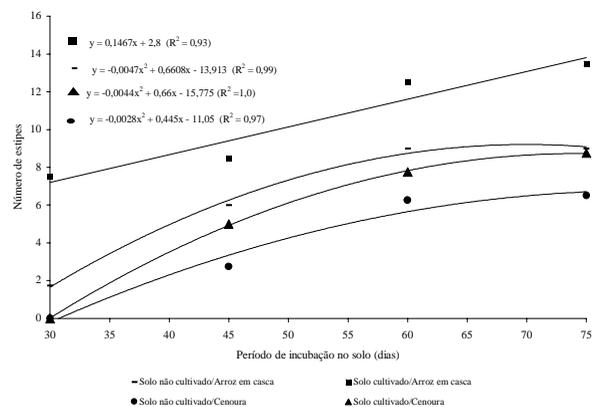


Figura 1. Efeito do tipo de solo e período de incubação no solo sobre a formação de estipes de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, formados em substratos à base de arroz em casca ou cenoura.

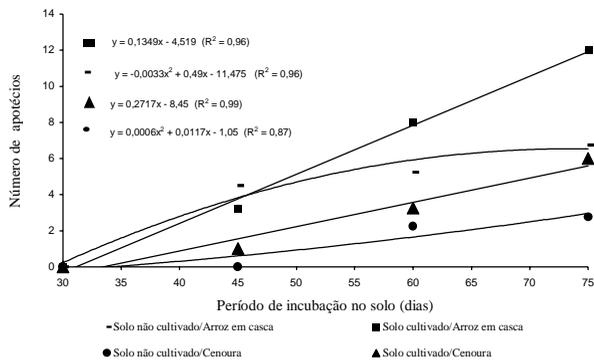


Figura 2. Efeito do tipo de solo e período de incubação no solo sobre a formação de apotécios de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, formados em substratos à base de arroz em casca ou cenoura.

Os dados referentes ao número médio de estipes e apotécios produzidos em substratos à base de arroz em casca ou cenoura, e incubados em solos cultivado e não cultivado, estão apresentados na Tabela 1. No substrato à base de arroz em casca, observou-se que o aumento do número de estipes formadas em escleródios enterrados em solo cultivado, em relação ao solo não cultivado, foi de mais de quatro vezes, aos 30 dias após a incubação dos escleródios no solo; enquanto aos 45, 60 e 75 dias após essa incubação houve aumentos de 42%, 39% e 50%, respectivamente.

Após 45 dias de incubação, o número de apotécios formados em escleródios enterrados em solo não cultivado foi maior em relação aos enterrados em solo cultivado. Por outro lado, aos 60 e 75 dias de incubação, o número de apotécios formados foi maior no solo cultivado do que no solo não cultivado, registrando-se aumentos de aproximadamente 52% e 78%, respectivamente.

Quando se utilizou o substrato à base de cenoura, observou-se que os números de estipes formadas aos 45, 60 e 75 dias após a incubação, no solo cultivado em comparação ao solo não cultivado,

Tabela 1. Número médio de estipes e apotécios de *Sclerotinia sclerotiorum*, formados em substratos à base de arroz em casca ou cenoura, e incubados em solos cultivado (SC) e não cultivado (SNC).

Tipo de solo	Substrato	Estrutura do fungo	dias após a incubação			
			30	45	60	75
SNC	Arroz	Estipes	1,75	6,0	9,0	9,0
		Apotécios	0,0	4,5	5,25	6,75
SC	Arroz	Estipes	7,5	8,5	12,5	13,5
		Apotécios	0,0	3,25	8,0	12,0
SNC	Cenoura	Estipes	0,0	2,75	6,25	6,5
		Apotécios	0,0	0,0	2,25	2,75
SC	Cenoura	Estipes	0,0	5,0	7,75	8,75
		Apotécios	0,0	1,01	3,25	6,0

foram superiores em 82%, 24% e 35% respectivamente; e o número de apotécios apresentou aumentos respectivos de 100%, 44% e 18%, do solo cultivado para o não cultivado, nesses períodos.

Apesar do arroz nunca ter sido relatado como planta hospedeira do fungo, o substrato à base deste produto foi o que apresentou a melhor produção de escleródios em relação ao substrato à base de cenoura. Os escleródios produzidos nesse meio apresentaram maior formação de estipes e apotécios, em ambos solos, sendo que, em geral, para o solo cultivado esse aumento foi ainda maior (Figura 3). Em trabalhos anteriores, Rios *et al.* (1996) relatam que os meios de grãos de sorgo e de arroz promoveram os maiores números de escleródios, seguidos dos meios de grãos de milho.

Outro aspecto importante do substrato à base de arroz em casca, também observado por Ferraz (1996), utilizando o substrato sorgo, foi a dificuldade em separar os escleródios do meio de origem. Essa dificuldade maior de separação dos escleródios produzidos no substrato arroz em casca decorre da grande aderência dos escleródios aos grãos, resultado da permanência de restos de substratos aderidos aos escleródios. Segundo esse autora, quando se obtêm escleródios com o objetivo de utilizá-los para ensaios de campo ou em condições controladas, os escleródios coletados com presença de restos de cultura podem levar à produção de escleródios secundários e, conseqüentemente ao aumento do inóculo ou às vezes dificultando ou retardando a formação de apotécios.

O substrato à base de cenoura apresentou um aspecto aquoso proporcionando um ambiente

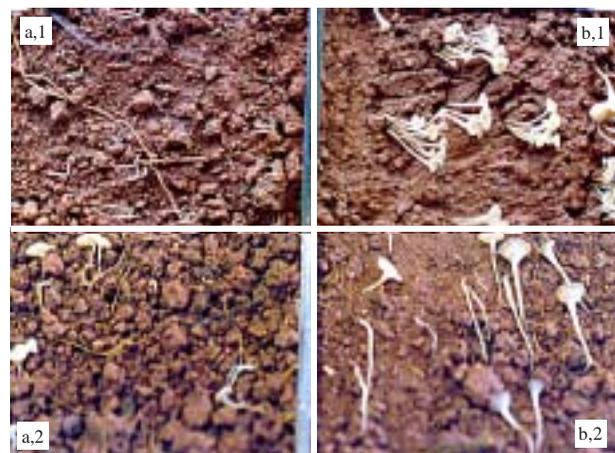


Figura 3. Efeito dos tipos solo, não cultivado (a) cultivado (b), na germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, formados em substrato a base de arroz em casca (1) ou cenoura (2)

anaeróbico enquanto, o substrato à base de arroz em casca, apresentou um ambiente extremamente seco. O mesmo ocorreu quando Ferraz & Café Filho (1998) utilizaram os substratos à base de grãos de sorgo e cenoura, relatando que para corrigir estes ambientes é necessário adição de maior volume de água ao sorgo e acréscimo de fubá ao meio cenoura.

## CONCLUSÕES

1. Ambos substratos foram eficientes para produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, entretanto, os escleródios formados em substrato à base de arroz em casca originaram maior número de apotécios quando enterrados no solo.
2. O tipo de solo influencia na germinação carpogênica de escleródios *S. sclerotiorum*. O solo não cultivado apresenta características supressivas evidenciadas por retardamento do aparecimento de estipes e formação mais lenta dos apotécios, além de uma redução do número de estipes e apotécios formados, em relação ao solo cultivado.

## REFERÊNCIAS

- Adams, P. B. & W. A. Ayers. 1979. Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, 69 (8): 896-899.
- Aidar, H. & P.R.C. Ferreira. 1996. Apresentação, p.2-3. In Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão, 5. Embrapa-CNPAP. Anais (Documentos 69)
- Coley-Smith, J. R. & R. C. Cooke. 1971. Survival and germination of fungal sclerotia. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto. California. 9: 65-92.
- Costa, J.G.C. & B. da S. Pinheiro. 2005. Apresentação, p.3. In Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão, 8. Embrapa-CNPAP. Anais (Documentos 182).
- Fernandes, N. T., B. A. Santos, L., Zambolin, G. M. Chaves & E. S. G. Mizubuti. 1993. Avaliação de meios de cultura naturais na produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Fitopatologia Brasileira*, 18 (supl.): 328 (Resumos).
- Ferraz, L. C. L. 1996. Biologia de *Sclerotinia sclerotiorum* e aspectos de controle cultural de mofo-branco em feijoeiro. Tese de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasília. 202 p.
- Ferraz, L. C. L. & A. C. Café Filho. 1998. Meios de cultura e fatores culturais para produção de escleródios e apotécios de *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro, *Fitopatologia Brasileira*, 23 (3): 364-369.
- Hornby, D. 1983. Suppressive soils. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto. California. 21: 65-85.
- Huinter, J.E.; G.S. Abawi & D.C. Croiser. 1978. Effects of timing, coverage, and spray oil control of white mold of snap bean with benomyl. *Plant Disease Report*, 62 (7): 633-637.
- Melo, I. S. & G. A. Conus. 1990. Influência de meios de cultura, temperatura e pH na produção de escleródios de *Sclerotinia minor* Jagger. *Revista de Agricultura*, 65 (3): 239-247.
- Patterson, C. L. & R. G. Grogan. 1989. Relationship of growth media and drying and of age of sclerotia to eruptive germination and infection by *Sclerotinia minor*. *Plant Disease Report*, 72 (12): 1046-1048.
- Philips, A. J. L. 1987. Carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytophylactica*, 19 (3): 279-283.
- Pozzer, L. & J.E. Cardoso. 1990. Supressividade natural de um Latossolo Vermelho-Escuro a *Rhizoctonia solani*. *Fitopatologia Brasileira*, 15 (3): 206-210.
- Prasad, Y., D. Itendra & I. Deb. 1988. Growth and sclerotia development in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal Res. Rajendra Agriculture University*, 6 (1): 78-79.
- Rios, G. P., C. C. Netto & A. C. de O. Gomes. 1996. Utilização de meios de cultura para produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* em laboratório, p. 216-217. In Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão. Embrapa-CNPAP. Anais (Documentos 69).
- Schneider, R.W. 1982. *Suppressive soils and plant disease*. St. Paul: American Phytopathological Society, 88 p.
- Vieira, C. 1988. *Doenças e pragas do feijoeiro*. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 231 p.
- Willems, H.J. & J.A.L. Wong 1980. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. *Botanical Review*, 46 (2): 102-165.