

MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE PLÂNTULAS DE FEIJOEIRO PARA AVALIAÇÃO DE GERMOPLASMA QUANTO A RESISTÊNCIA A *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary¹

Eliane Divina de Tolêdo-Souza² e Jefferson Luis da Silva Costa³

ABSTRACT

INOCULATION METHODS OF COMMON BEAN SEEDLINGS FOR EVALUATION OF GERMOPLASM RESISTANCE TO *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary

The development of a reliable method of inoculation of dry bean (*Phaseolus* spp.) with *Sclerotinia sclerotiorum* is of great importance for evaluation of genotypes for resistance to white mold. The objective of this study was to test three inoculation methods in different parts of 11-day-old *Phaseolus* spp seedlings. The plant was inoculated with a suspension of ascospores at the blossom stage as a reference for comparing the efficiency of the methods tested, since it simulates field infections. The methods consisted of the inoculation of leaves or axils with disks of PDA containing mycelia; and inoculation of the stems with a toothpick colonized by the pathogen. Nine dry bean genotypes of *Phaseolus* spp. and two isolates of *S. sclerotiorum* (UnB 1541 and UnB 1547) were used to test the methods. The inoculated plants were incubated in a fog room, with 100% humidity, a temperature of 21±2°C and a photoperiod of 12 hours. The incubating period varied from two days for the PDA disk leaf inoculation, four days for the axil inoculation and ten days for stems inoculation with toothpicks colonized by the pathogen and flowers inoculation with ascospores. Disease assessment was accomplished by using a key ranging from 1 to 9 (1= no symptoms; 9= plant dead). Inoculation of seedlings in the axils using PDA disks containing mycelia was the best method to differentiate the genotypes, it also presented similar results to the inoculation of flowers with ascospores. The isolate UnB 1541 was more virulent than UnB 1547, and discriminated better the genotypes for resistance or susceptibility to *S. sclerotiorum*.

KEY WORDS: White mold, genetic resistance, *Phaseolus* spp, inoculation method.

RESUMO

O desenvolvimento de uma metodologia adequada à inoculação de plantas do feijoeiro com *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary é de grande importância para avaliação de genótipos quanto à resistência ao mofo branco. O objetivo deste trabalho foi testar a eficiência de três métodos de inoculação em diferentes partes da plântula de feijoeiro aos onze dias após a emergência. Uma suspensão de ascósporos, inoculada em plantas em estágio de floração, foi utilizada para validar os métodos testados. Os métodos constituíram da inoculação de folhas ou axilas foliares com discos de BDA contendo micélio do fungo e inoculação das hastes com palito colonizado pelo patógeno. Nove genótipos do gênero *Phaseolus* spp. e dois isolados de *S. sclerotiorum* (UnB 1.541 e UnB 1.547) foram utilizados para comparar os métodos. Após a inoculação, as plantas permaneceram em câmara de nevoeiro, com umidade aproximada de 100%, temperatura de 21±2°C e fotoperíodo de 12 horas de luz/ 12 horas de escuro. Permaneceram, então, dois dias para o método de inoculação das folhas com discos de BDA, quatro dias para o método de inoculação das axilas, e dez dias para os métodos de inoculação das hastes com palitos colonizados pelo patógeno e inoculação das flores com ascósporos. Após os períodos determinados para cada método, as avaliações foram realizadas, utilizando-se uma escala de notas variando de 1 a 9 (1= ausência de sintomas e 9= morte da planta). O método de inoculação nas axilas das plântulas, com discos de BDA contendo micélio do fungo, discriminou melhor os genótipos, apresentando resultados similares à inoculação de flores com ascósporos. O isolado UnB 1.541 apresentou maior agressividade e discriminou melhor os genótipos quanto a sua resistência ou suscetibilidade a *S. sclerotiorum*.

PALAVRAS-CHAVE: Mofo branco, resistência genética, *Phaseolus* spp, método de inoculação.

INTRODUÇÃO

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* [(Lib.) De Bary] causa uma doença comumente conhecida como mofo branco. É um patógeno habitante do solo, que afeta muitas culturas economicamente importantes, inclusive o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.).

Ao se avaliar germoplasma em busca de fontes de resistência a doenças, métodos eficientes de infecção uniforme das plântulas com isolados virulentos do patógeno são requisitos essenciais. Alguns métodos de inoculação, em condições controladas, têm sido empregados com sucesso em diversas

1. Parte da dissertação do primeiro autor, apresentada à Universidade Federal de Goiás e desenvolvida na Embrapa Arroz e Feijão. Trabalho recebido em set./2002 e aceito para publicação em out./2003 (registro nº 498).
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: elianetolledo@realizant.com.br
3. Embrapa Arroz e Feijão / Embrapa Tabuleiros Costeiros. E-mail: jcosta@cpatc.embrapa.br

culturas. Chun *et al.* (1987) avaliaram cultivares comerciais de soja [*Glycine max* (L.) Merril.] quanto à resistência à podridão da haste, causada por *S. sclerotiorum*, utilizando o método de inoculação de discos de micélio em haste de plântulas. Pratt & Rowe (1991) verificaram diferenças na resistência de genótipos de alfafa (*Medicago sativa* L.) quando comparou tamanho de lesões em hastes inoculadas com algodão colonizado por *S. sclerotiorum* e *S. trifoliorum*. Peres & Regnautt (1993) detectaram diferença na virulência de dois isolados de *S. sclerotiorum* por meio da inoculação de escleródios em raízes de girassol (*Helianthus annuus* L.). Pratt & Rowe (1995) observaram diferenças na virulência de isolados de *S. sclerotiorum* e de *S. trifoliorum*, originados de distintas regiões geográficas e plantas hospedeiras, quando inoculados em folhas de alfafa com micélio seco.

Metodologias para seleção de cultivares de feijão, resistentes ao referido patógeno têm sido estudadas na tentativa de se estabelecer eficiência e rapidez nesse tipo de trabalho. No gênero *Phaseolus*, a inoculação por 'tempo limitado', uma técnica relativamente sensível para comparar interações entre feijão e *S. sclerotiorum*, foi desenvolvida por Hunter *et al.* (1981). O procedimento consiste na remoção precoce do inóculo (48 horas após a inoculação em sítio específico) para reduzir a severidade da doença e melhor revelar a resistência parcial que é superada com períodos mais longos de incubação. Esta técnica é útil para selecionar germoplasma com resistência parcial ou graus maiores de resistência como o identificado em *Phaseolus coccineus* (Adams *et al.* 1973, Steadman *et al.* 1974, Hunter *et al.* 1981, Hunter *et al.* 1982), híbridos de *P. vulgaris* x *P. coccineus* (Abawi *et al.* 1975), e *Phaseolus* spp. (Midleton & Reddenz 1990). Miklas *et al.* (1992) utilizaram hastes de feijoeiro com onze e 28 dias, cortadas e inoculadas com micélio. Schwartz *et al.* (1987) estabeleceram uma metodologia de inoculação para teste de resistência em que era necessária a infestação do solo com escleródios, noventa dias antes do plantio, garantindo a formação de apotécios no período da floração. Um método simples que não requer plantas em florescimento foi utilizado por Leone & Tonnejick (1990) para selecionar cultivares de feijoeiro a *S. sclerotiorum*. Folhas primárias destacadas foram pulverizadas com uma suspensão de ascósporos, sendo necessária a adição de KH_2PO_4 ou de misturas de fosfato inorgânico e glicose, ao inóculo, para estimular a patogenicidade.

Este trabalho teve como objetivo testar metodologias de inoculação em plântulas de feijoeiro para a discriminação de genótipos, quanto à resistência a isolados de *S. sclerotiorum* com diferentes níveis de virulência. Também buscou validar esses métodos, comparando-os com o método de inoculação de plantas em florescimento com suspensão de ascosporos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados oito experimentos em casa de vegetação. Utilizaram-se nove genótipos do gênero *Phaseolus*, sendo três pertencentes à espécie *P. vulgaris* (cultivares Pérola, Ex Rico 23 e A55), dois pertencentes à espécie *P. aborigineus* (GL 409 e GL 113), dois pertencentes a *P. acutifolius* (GL 265 e GL 489), um representante da espécie *P. multigaris* (GL 284), e um híbrido interespecífico entre *P. vulgaris* x *P. coccineus* (IAPAR 72). As sementes foram obtidas junto ao Banco de Germoplasma da Embrapa Arroz e Feijão e ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR).

Os isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*, UnB 1.541 (mais virulento) e UnB 1.547 (menos virulento), obtidos junto a Micoteca do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília, foram escolhidos em função do resultado do estudo de caracterização fisiológica realizada por Ferraz (1996). Os escleródios utilizados como inóculo inicial foram produzidos em meio de cultura cenoura, conforme descrito por Ferraz & Café Filho (1998).

Realizou-se a semeadura em solo do tipo Latossolo Vermelho Escuro (LVE) autoclavado. Nos métodos de inoculação de plântulas, utilizaram-se copos plásticos de 300 ml de capacidade e as plântulas foram inoculadas aos onze dias após a emergência. No método de inoculação de plantas em florescimento, utilizaram-se vasos com 2,0 kg de capacidade, e a inoculação foi realizada no estágio R6.

Os experimentos foram desenvolvidos em delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 9 x 3 x 2, com seis repetições. O método de inoculação das plantas em florescimento não integrou a análise conjunta dos dados, sendo utilizada apenas para comparar e validar os métodos. Todos os experimentos foram replicados duas vezes. O teste de Tukey a 5% de probabilidade foi utilizado para comparação de médias.

Métodos de inoculação utilizando discos de BDA contendo micélio do fungo

Escleródios esterilizados superficialmente foram depositados no centro das placas de Petri contendo meio de cultura Batata, Dextrose e Ágar (BDA) mais 1% de sulfato de estreptomicina, e colocadas em câmara incubadora por sete dias à 22°C, sob fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Discos contendo micélio foram retirados da borda das colônias com o auxílio de um furador de rolhas de 0,7 cm de diâmetro, e inoculados nas plântulas de forma invertida, ou seja, a superfície que continha o micélio foi colocada em contato com a plântula. A testemunha consistiu de discos de BDA sem micélio colocados nas folhas. A inoculação foi realizada nas folhas primárias e nas axilas das folhas primárias.

As plântulas inoculadas foram transferidas para câmara de nevoeiro com umidade aproximada de 100%, temperatura de 21±2°C e fotoperíodo de 12 h de luz / 12 h de escuro. Ali permaneceram por 48 horas para o método de inoculação das folhas e 96 horas para o método de inoculação das axilas das folhas, quando se procedeu a avaliação. Para a avaliação de plântulas inoculadas nas folhas mediu-se o comprimento das lesões, a partir do ponto de inoculação com auxílio de um paquímetro. Para a avaliação das plântulas inoculadas nas axilas das folhas primárias, foram atribuídas notas, variando de 1 a 9, em que: 1=ausência de sintomas na plântula; 2 = início do desenvolvimento de uma lesão circular; 3 = lesão de até 1,0 cm de comprimento; 4 = lesão entre 1,0 e 1,5 cm de comprimento; 5 = lesão maior que 1,5 cm de comprimento; 6 = lesões na haste, presença de micélio e murcha de uma das folhas; 7 = lesões na haste e presença de micélio e murcha de ambas as folhas; 8 = plântula com sintoma de murcha geral, devido ao intenso desenvolvimento micelial; 9 = plântula morta.

Para diferenciar os métodos, numa análise conjunta de variância, os dados referentes ao tamanho das lesões, no método de inoculação das folhas primárias, foram adaptados para uma escala de severidade, variando de 1 a 9, em que 1 correspondeu ao menor comprimento de lesão e 9 correspondeu ao maior comprimento de lesão obtido.

Método de inoculação da haste do feijoeiro utilizando palito colonizado pelo fungo

Nesse método utilizou-se uma variação da metodologia descrita por Hildebrand (1953), no qual

pontas de palitos de dente (1,5 cm) foram inseridas verticalmente em um disco de papel de filtro com o mesmo diâmetro interno de uma placa de Petri. Depois de colocados dentro das placas, com a parte protuberante dos palitos voltada para cima, estes foram esterilizados duas vezes em autoclave a 120°C por trinta minutos. Ver-teu-se, então, o meio de cultivo BDA acrescido de sulfato de estreptomicina, deixando expostos cerca de 2 mm da extremidade dos palitos. As placas de Petri assim preparadas foram inoculadas com cinco escleródios, eqüidistantemente distribuídos, e incubadas em sala climatizada por cerca de sete dias, a 22°C com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Por ocasião da inoculação, os palitos estavam com suas extremidades totalmente colonizadas pelo fungo. Após esse período de incubação, os palitos foram inseridos nas hastes entre as folhas primárias de plântulas de *Phaseolus* spp. A testemunha foi obtida pela perfuração da haste com palitos apenas esterilizados. As plântulas inoculadas foram transferidas para câmara de nevoeiro com umidade aproximada de 100%, temperatura de 21±2°C e fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro. A avaliação foi realizada dez dias após a inoculação das plântulas com a mesma escala de notas utilizada para a avaliação do método de inoculação das axilas das folhas primárias.

Método de inoculação das flores utilizando uma suspensão de ascósporos

Nesse caso, a adubação de plantio consistiu de 1,0 g da fórmula 04-30-16 + Zn por vaso, seguida por duas adubações de cobertura com 0,5 g de sulfato de amônio, aos 21 e 40 dias após a emergência das plântulas. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação até a floração.

Uma mistura de solo e água destilada, numa proporção que simulou a capacidade de campo, foi colocada em caixas Ger-box. Posteriormente enterraram-se trinta escleródios por caixa e foram mantidos em incubadora a uma temperatura de 21±2°C, para formação de apotécios. O início da formação dos apotécios ocorreu aproximadamente aos 40 dias após o enterrio, sendo que foram necessários reabastecimentos com água durante este período. Após a completa maturação dos apotécios, sendo esta observação feita pela liberação dos ascósporos, quando da abertura das caixas, os apotécios foram cortados pelas estirpes, colocados num cadinho, macerados adicionando cerca de 5 ml de água destilada, e coados utilizando-se voal de seda.

A suspensão de ascósporos obtida foi ajustada em hemacitômetro para uma concentração de $1,2 \times 10^5$ ascósporos/ml de água. Com o auxílio de um atomizador De vilbiss, as plantas (na fase R6) foram pulverizadas com essa suspensão e, posteriormente, transferidas para câmara de nevoeiro à temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade aproximada de 100%. No tratamento testemunha a pulverização foi realizada apenas com água destilada.

A avaliação ocorreu aos dez dias após a inoculação, utilizando também uma escala de notas (1 = ausência de sintomas; 2 = aproximadamente 5% da planta infectada; 3 = 10% da planta infectada; 4 = 15% da planta infectada; 5 = 25% da planta infectada; 6 = 40% da planta infectada; 7 = 60% da planta infectada; 8 = 80% da planta infectada; 9 = mais de 80% da planta infectada). Para comparação com demais métodos utilizou-se um índice de similaridade determinado pela porcentagem de genótipos que possuíam a mesma classe de reação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise conjunta da variância mostrou que houve efeito significativo de método, de isolado e de genótipos na severidade de doença do feijoeiro. As interações métodos x isolados, métodos x genótipos, isolados x genótipos e métodos x isolados x genótipos foram também significativas (Tabela 1).

O método de inoculação da haste ocasionou maior severidade de doença, e não diferiu significativamente do método de inoculação da axila da folha. Ambos diferiram do método de inoculação da folha, que apresentou uma menor severidade de doença (Tabela 2). O método de inoculação da folha não discriminou os genótipos (Tabela 3), apenas

Tabela 1. Análise conjunta de variância para tamanho de lesões¹ obtidas de diferentes métodos de inoculação com isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*, para avaliação da resistência de genótipos de feijoeiro (*Phaseolus* spp.)¹

Fonte de variação	GL	QM	F	P>F
Métodos	2	35,8	17,8	0,0001
Genótipos	8	107,2	53,4	0,0001
Isolados	1	159,0	79,3	0,0001
Métodos x Genótipos	16	22,8	11,4	0,0001
Métodos x Isolados	2	31,1	15,5	0,0001
Genótipos x Isolados	8	8,6	4,3	0,0001
Método x Genótipos x Isolados	16	8,4	4,2	0,0001

¹- Dados expressos em escala de 1 (menor comprimento de lesão) a 9 (maior comprimento de lesão); C.V. = 43,0 %.

Tabela 2. Médias das notas atribuídas aos genótipos de *Phaseolus* spp., inoculados com isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* por quatro métodos

Isolado	Métodos				Média ⁵
	Folha ¹	Axila ²	Haste ³	Flores ⁴	
UnB-1.541	4,7 b ⁶	5,2 b	4,8 a	5,1 b	4,9 b
UnB-1.547	2,4 a	3,6 a	4,5 a	4,5 a	3,5 a
Média	3,6 A	4,4 B	4,7 B	4,8	—
C.V.(%)	22,4	27,9	42,4	21,1	—

¹- Inoculação de folhas primárias com discos de BDA contendo micélio do fungo.

²- Inoculação das axilas das plântulas com discos de BDA com micélio do fungo.

³- Inoculação das hastes utilizando palitos colonizados pelo fungo.

⁴- Inoculação das flores utilizando uma suspensão de ascósporos.

⁵- Médias dos métodos de inoculação das folhas, axilas e hastes.

⁶- Médias seguidas de mesma letra minúscula, na vertical, e maiúscula, na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

diferenciou os isolados (Tabela 2). Já o método de inoculação da haste não diferenciou os isolados (Tabela 2), mas sim os genótipos (Tabela 3); enquanto o método de inoculação da axila discriminou tanto os genótipos (Tabela 3) como os isolados (Tabela 2).

Os resultados obtidos com o método de inoculação da haste confirmaram os de Oliveira & Kimati (1999), que relataram esse método como sendo de baixa reprodutibilidade, apresentando um alto coeficiente de variação, indicando a necessidade de um grande número de repetições para maior confiabilidade. Apesar de não haver discriminado satisfatoriamente os genótipos, o método de inoculação da folha primária foi considerado de fácil e rápida execução em relação aos demais. Esse método poderia ter sido mais eficiente, se mensurado o tamanho proporcional da lesão em relação ao comprimento da folha. Assim, esse método é de grande valia nos estudos relativos à eficiência do controle químico no manejo da doença (Costa 2000).

O método de inoculação que utiliza uma suspensão de ascósporos nas flores foi de execução mais demorada e complexa, porém, foi utilizado com o objetivo de validar os métodos de inoculação e confirmar os potenciais de resistência ou suscetibilidade de alguns genótipos. Os índices de similaridade desse método, segundo as classes de reação dos genótipos, foram 67% relativamente à inoculação da axila das folhas, 56% em relação à inoculação da haste e 33% em relação à inoculação da folha (Tabela 4). Isso confirma que, dentre os métodos avaliados, o de inoculação das axilas das folhas foi o mais eficiente, pois, além de ter discriminado genótipos e isolados, foi também o que apresentou resultados mais parecidos com o método de inoculação de flores, considerado como o método padrão por simular uma epidemia no campo.

Tabela 3. Reação de genótipos de *Phaseolus* spp à inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* por diferentes métodos

Genótipo	Métodos							
	Folha ¹		Axila ²		Haste ³		Flores ⁴	
	UnB 1.547	UnB 1.541 ⁵	UnB 1.547	UnB 1.541	UnB 1.547	UnB 1.541	UnB 1.547	UnB 1.541
<i>P. aborigineus</i> (GL 113)	2,3 a A	3,7 ⁶ a B ⁷	1,7 a A	4,0 bc B	3,2 abc A	5,0 ab A	2,5 a A	3,2 b A
<i>P. multigaris</i> (GL 284)	2,7 a A	3,5 a A	3,2 a A	4,5 bc B	6,5 cd A	6,0 bc A	6,0 d A	8,5 ef B
<i>P. acutifolius</i> (GL 265)	2,5 a A	6,2 b B	8,5 b A	9,0 d A	9,0 cd B	5,3 ab A	8,3 f A	8,2 e A
<i>P. acutifolius</i> (GL 489)	2,8 a A	5,5 b B	8,7 b A	9,0 d A	9,0 cd A	9,0 c A	7,3 e A	9,0 f B
<i>P. aborigineus</i> (GL 409)	2,5 a A	3,7 a A	1,3 a A	3,8 abc B	1,2 a A	5,0 ab B	3,2 b A	2,8 abA
<i>P. vulgaris</i> (Ex Rico 23)	2,2 a A	3,8 a B	2,2 a A	3,5 ab B	1,5 a A	3,0 ab A	2,3 a A	2,3 a A
<i>P. vulgaris</i> (A 55)	1,8 a A	4,2 a B	3,3 a A	6,0 c B	5,5 bcdA	3,0 ab A	4,7 c A	5,5 d A
<i>P. vulgaris</i> (Pérola)	2,2 a A	5,5 b B	2,0 a A	1,7 a A	2,2 ab A	2,2 a A	2,2 a A	2,3 a A
<i>P. vulgaris</i> x <i>P. coccineus</i> (IAPAR 72)	2,2 a A	6,7 b B	1,7 a A	5,0 bc B	2,7 ab A	4,5 ab A	4,2 c A	3,8 c A
Média	2,4	4,7	3,6	5,2	4,5	4,8	4,5	5,1
C.V. (%)	22,4		27,9		42,4		21,1	

¹- Inoculação de folhas primárias com discos de BDA contendo micélio do fungo.

²- Inoculação das axilas das plântulas com discos de BDA com micélio do fungo.

³- Inoculação das hastes utilizando palitos colonizados pelo fungo.

⁴- Inoculação das flores utilizando uma suspensão de ascósporos.

⁵- Isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*

⁶- Comprimento de lesões adaptado à escala de notas.

⁷- Médias seguidas de mesma letra minúscula, na vertical, e maiúscula, na horizontal (para isolados no mesmo método), não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os genótipos Pérola, Ex Rico 23 e GL 409 (*P. aborigineus*) foram moderadamente resistentes (MR); GL 113 (*P. aborigineus*), IAPAR 72 (*P. vulgaris* x *P. coccineus*), A55 (*P. vulgaris*) e GL 284 (*P. multigaris*) comportaram-se como moderadamente suscetíveis (MS); GL 265 (*P. acutifolius*) como suscetível (S); e GL 489 (*P. acutifolius*) como altamente suscetível (AS) (Tabela 4). O genótipo Pérola apresentou, em três dos quatro métodos testados, menor suscetibilidade, concordando com os

resultados obtidos por Karl (1997), que reportou, dentre outros cultivares, Pérola como apresentando menores lesões, em dois métodos de inoculação testados.

Comparando-se os resultados de virulência dos isolados (Tabela 2), UnB 1.541 mostrou-se mais virulento que o isolado UnB 1.547, nos métodos de inoculação de folhas, axilas e flores. O método de inoculação das hastes não apresentou diferença estatística significativa entre os dois isolados

Tabela 4. Reação de genótipos de *Phaseolus* spp., inoculados com isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* por diferentes métodos

Genótipos	Métodos				Média ⁵	Classe de reação ⁸
	Folha ¹	Axila ²	Haste ³	Flores ⁴		
<i>P. aborigineus</i> (GL 113)	3,0 ⁶ a ⁷	2,8 ab	4,1 ab	2,8 ab	3,3 abc	MS
<i>P. multigaris</i> (GL 284)	3,1 a	3,8 bc	6,3 bc	7,3 d	4,4 d	MS
<i>P. acutifolius</i> (GL 265)	4,3 b	8,8 d	7,2 cd	8,3 d	6,8 e	S
<i>P. acutifolius</i> (GL 489)	4,2 b	8,8 d	9,0 d	8,2 d	7,3 e	AS
<i>P. aborigineus</i> (GL 409)	3,1 a	2,6 ab	3,1 a	3,0 ab	2,9 ab	MR
<i>P. vulgaris</i> (Ex Rico 23)	3,0 a	2,8 ab	2,3 a	2,3 a	2,7 a	MR
<i>P. vulgaris</i> (A 55)	3,0 a	4,7 c	4,3 ab	5,1 c	4,0 cd	MS
<i>P. vulgaris</i> (Pérola)	3,8 ab	1,8 a	2,2 a	2,3 a	2,6 a	MR
<i>P. vulgaris</i> x <i>P. coccineus</i> (IAPAR 72)	4,4 b	3,3 abc	3,6 a	4,0 bc	3,8 bcd	MS
Média	3,6 A	4,4 B	4,7 B	4,8	-	-
C.V. (%)	22,4	27,9	42,4	21,1	-	-

¹- Inoculação de folhas primárias utilizando discos de BDA contendo micélio do fungo; ²- Inoculação das axilas das plântulas utilizando discos de BDA contendo micélio do fungo;

³- Inoculação das hastes utilizando palitos colonizados pelo fungo; ⁴- Inoculação das flores utilizando uma suspensão de ascósporos; ⁵- Médias dos métodos de inoculação das folhas, axilas e hastes;

⁶- Comprimento de lesões adaptado à escala de notas; ⁷- Médias seguidas de mesma letra minúscula, na vertical e maiúscula, na horizontal (para isolados no mesmo método), não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; e

⁸- Classes de reações de acordo com a média (R= Resistente - notas de 1,0-2,0; MR= Moderadamente resistente - notas de 2,1-3,0; MS= Moderadamente suscetível - notas de 3,1-5,0; S= Suscetível - notas de 5,1-7,0 e AS= Altamente suscetível - notas de 7,1-9,0).

estudados. O isolado UnB 1.541 apresentou uma maior virulência e uma melhor diferenciação dos genótipos, quanto aos seus graus de resistência em relação ao isolado UnB 1.547. Esses resultados corroboram aquele obtido por Ferraz (1996) quanto à classificação de isolados, considerando resultados conjuntos de crescimento micelial e agressividade em plantas de feijão.

Alguns autores observaram diferenças de virulência entre isolados (Riddle *et al.* 1991, Peres & Regnautt 1993, Pratt & Rowe 1995) enquanto outros não a observaram (Miklas *et al.* 1992, Karl 1997). Miklas *et al.* (1992), utilizando hastes cortadas do feijoeiro para medir a virulência de dezoito isolados de *S. sclerotiorum*, concluíram que esses isolados não diferiram estatisticamente quanto à virulência avaliada pelo comprimento da lesão ocasionada na haste. Segundo Karl (1997), para a maioria dos cultivares por ela avaliados não foi observada diferença estatística entre os isolados, pelos métodos do alfinete e do palito. Resultados semelhantes foram obtidos neste estudo para o método de inoculação utilizando palito colonizado, que não apresentou diferenças estatísticas entre os isolados utilizados (Tabela 2). Entretanto, Peres & Regnautt (1993) observaram a diferença na virulência de dois isolados de *S. sclerotiorum* por meio da inoculação de escleródios em raízes de girassol (*Helianthus annuus* L.). Similarmente, nos experimentos conduzidos por Pratt & Rowe (1995), isolados de *S. sclerotiorum* e de *S. trifoliorum* inoculados em cultivares de alfafa (*Medicago sativa* L.) diferiram quanto à virulência. Resultados semelhantes foram obtidos no presente estudo para os métodos de inoculação das folhas primárias, inoculação das axilas das plântulas e inoculação das flores com ascósporos, que demonstraram haver uma diferença de virulência entre os isolados. Isso indica a necessidade de escolha criteriosa de isolado para validar uma técnica de inoculação.

CONCLUSÕES

1. A inoculação da axila das folhas com discos de BDA contendo micélio do fungo diferenciou melhor os genótipos quanto à resistência a *Sclerotinia sclerotiorum*.
2. O método de inoculação da axila das folhas discriminou os genótipos e diferenciou os isolados, e apresentou uma maior similaridade, quanto à

classe de reação dos genótipos, com o método de inoculação de flores com ascósporos.

3. O isolado UnB 1.541 foi o mais virulento e identificou melhor a variabilidade existentes entre os genótipos.

REFERÊNCIAS

- Abawi, G. S., R. Provvidenti & J. E. Hunter. 1975. Evaluating bean germplasm for resistance to *Wetzelinia sclerotiorum*. p. 50. In Proc. American Phytopathology Society, 2. Miami, Florida. 250 p. Abstract.
- Adams, P. B., C. J. Tate, R. D. Lumsden & J. P. Meiners. 1973. Resistance of *Phaseolus* species to *Sclerotinia sclerotiorum*. Annual Report Bean Improvement Cooperative, 16 (1): 8-9.
- Chun, D., L. B. Kao, J. L. Lockwood & T. G. Isleib. 1987. Laboratory and field assessment of resistance in soybean to stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Disease, 71(9): 811-815.
- Costa, G. R. 2000. Estudos complementares sobre a eficiência de fungicidas no controle do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) em condições controladas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, Goiás. 71 p.
- Ferraz, L. C. L. 1996. Biologia de *Sclerotinia sclerotiorum* e aspectos de controle cultural de mofo-branco em feijoeiro. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Brasília, Distrito Federal. 161 p.
- Ferraz, L. C. L. & A.C. Café Filho. 1998. Meios de cultura e fatores culturais para a produção de escleródios e apotécios de *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro. Fitopatologia brasileira, 23 (3): 364-369.
- Hildebrand, A. A. 1953. An elaboration of toothpick method of inoculating plants. Canadian Journal of Agricultural Science, 33 (4): 596-598.
- Hunter, J. E., M. H. Dickson, M. A. Boettger & J. A. Cigna. 1982. Evaluation of plant introductions of *Phaseolus* spp. for resistance to white mold. Plant Disease, 66 (4): 320-322.
- Hunter, J. E., M. H. Dickson & J. A. Cigna. 1981. Limited-term inoculation: a method to screen bean plants for partial resistance to white mold. Plant Disease, 65 (5): 414-417.
- Karl, A. C. 1997. Mofo Branco, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, em feijoeiro irrigado: estudos epidemiológicos, comparação de sistemas de cultivo e de cultivares. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Brasília, Distrito Federal. 117 p.

- Leone, G. & A. E. G. Tonnejck. 1990. A rapid procedure for procedure for screening the resistance of bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*) to *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Euphytica*, 48 (2): 87-90.
- Middleton, K. K. & J. Reddenz. 1990. Selection of *Sclerotinia sclerotiorum* resistance from a *Phaseolus* spp. germplasm collection. Annual Report Bean Improvement Cooperative, 33 (2): 189-190.
- Miklas, P. N., K. F. Grafton & B. D. Nelson. 1992. Screening for partial physiological resistance to white mold in dry bean using excised stems. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 117 (2): 321-327.
- Oliveira, S. H. F. & H. Kimati. 1999. Produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* para inoculação em plântulas de feijoeiro. *Summa Phytopathologica*, 25 (1): 39.
- Peres, A. & Y. Regnault. 1993. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary on root-collar: biology and development of a contamination method on sunflower. p.1-7. In Intern. *Sclerotinia* workshop, 8th. Toronto, Ontário. 51 p. Abstract.
- Pratt, R. G. & D. E. Rowe. 1995. Comparative pathogenicity of isolates of *Sclerotinia trifoliorum* and *S. sclerotiorum* on alfafa cultivars. *Plant Disease*, 79 (4): 474-477.
- Pratt, R. G. & D. E. Rowe. 1991. Differential responses of alfafa genotypes to stem inoculations with *Sclerotinia trifoliorum* and *S. sclerotiorum*. *Plant Disease*, 75 (2): 188-191.
- Riddle, G. E., L. L. Burpee, & G. Bolland. Virulence of *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor* on dandelion (*Taraxacum officinale*). *Weed science*, 39 (1): 109-118. 1991.
- Schwartz, H. F., D. H. Casciano, J. A. Asenga & D. R. Wood. 1987. Field measurement of white mold effects upon dry beans with genetic resistance or upright plant architecture. *Crop Science*, 27 (4): 699-702.
- Steadman, J. R., D. P. Coyne & H.F. Schwartz. 1974. Field reaction of beans to severe white mold infection. Annual Report Bean Improvement Cooperative, 17 (1): 84-85.