

ÂNGELA PIMENTA PERES

**DETECÇÃO DE *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary EM SEMENTES
DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.) E SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill):
DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitossanidade para obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. LUIZ CARLOS BHERING NASSER

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1996**

Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da Biblioteca Central da UFLA

Peres, Ângela Pimenta

Detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e soja (*Glycine max* (L.) Merrill): desenvolvimento de metodologias / Ângela Pimenta Peres. -- Lavras: UFLA, 1996.

51 p. : il.

Orientador: Luiz Carlos Bhering Nasser.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia

1. Feijão - Doença - Fungo. 2. Mofo branco. 3. Semente. 4. Metodologia. 5. Detecção. 6. *Sclerotinia sclerotiorum*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.65294

ÂNGELA PIMENTA PERES


DETECÇÃO DE *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary EM SEMENTES DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.) E SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill): DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitossanidade para obtenção do título de Mestre.

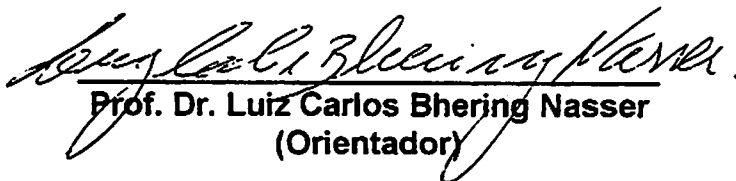
APROVADA em 30 de agosto de 1996



Prof. Dr. José da Cruz Machado



Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu



Prof. Dr. Luiz Carlos Bhering Nasser
(Orientador)

Aos meus pais,
Carlos e Marília
por mais esta conquista,

DEDICO.

Aos meus irmãos,
Eduardo e Leandro,

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras - UFLA e seu Departamento de Fitossanidade, pela acolhida;

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;

Ao professor Luiz Carlos Bhering Nasser, pela confiança, respeito e amizade;

Aos professores do Departamento de Fitossanidade, minha gratidão pelos ensinamentos tão valiosos à minha vida profissional;

À professora Maria das Graças G. C. Vieira e Prof. Mário Sobral de Abreu, pelas valiosas sugestões;

Ao Engenheiro Agrônomo Lúcio Tolentino Amaral, pelo incentivo e apoio à pesquisa;

À Carlos Alberto Nunes Lopes, pelo apoio e estímulo;

Agradeço às funcionárias do Laboratório de Patologia de Sementes, em especial à Cleuza pela colaboração e incentivo;

Ao acadêmico do curso de Agronomia, Sérgio Villela Lemos, pelo auxílio na montagem dos experimentos;

Aos colegas do curso de Pós-graduação em Fitossanidade: Adriane, Samara, Gilma, Eduardo, Edson, Jamilson e Leonardo e todos os funcionários, em especial à Maria de Lourdes e Heloísa, pelo feliz convívio;

Às companheiras Renata, Cátia, Carla, Iraídes e Vera, pela amizade;

Meu agradecimento especial à Kleber Villela Araújo, pelo carinho, companheirismo, incentivo e apoio em todas as etapas de condução deste trabalho;

Agradeço especialmente ao Prof. José da Cruz Machado, que me orientou sempre mostrando que uma das melhores maneiras de dar um sentido para a vida é procurar deixar o mundo um pouco melhor do que nós o encontramos.

BIOGRAFIA DA AUTORA

Ângela Pimenta Peres, filha de Carlos Guimarães Peres e Marília Pimenta Peres, nasceu em Montes Claros, Minas Gerais, à 20 de maio de 1967.

Em 1990 formou-se em Agronomia pelo Instituto Superior de Ensino e Pesquisa de Ituiutaba, M. G.

De maio de 1991 à fevereiro de 1993 trabalhou na EMATER-MG, na região norte de Minas Gerais.

De abril à julho de 1993 exerceu o cargo de professora substituta de Culturas II no Colégio Agrícola Antônio Augusto Versiani da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, em Montes Claros, Minas Gerais.

Em fevereiro de 1994 iniciou o curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Fitossanidade/Fitopatologia, no Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal de Lavras - UFLA, concluindo-o em agosto de 1996.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
4 CAPÍTULO I. OBTENÇÃO DE SEMENTES DE FEIJÃO (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) E SOJA (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill) INFECTADAS COM <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary	14
RESUMO	14
ABSTRACT	15
4.1 INTRODUÇÃO	16
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.2.1 Obtenção dos isolados em cultura pura	18
4.2.2 Padronização da metodologia de inoculação de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em sementes de feijão e soja	18
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.4 CONCLUSÕES	24
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
5 CAPÍTULO II. UTILIZAÇÃO DE SUBSTRATOS SEMI-SELETIVOS PARA A DETECÇÃO DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary, EM SEMENTES DE FEIJÃO (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) E SOJA (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill)	26
RESUMO	26
ABSTRACT	27
5.1 INTRODUÇÃO	28
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	30

5.2.1 Detecção de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em meio NEON e suas modificações	30
5.2.2 Comportamento da microflora associada a sementes de feijão e soja no meio NEON	32
5.2.2.1 Obtenção dos isolados	32
5.2.2.2 Avaliação do comportamento de fungos no meio NEON	33
5.2.2.3 Avaliação do comportamento de bactérias no meio NEON	33
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.3.1 Detecção de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em meio NEON e suas modificações	34
5.3.2 Comportamento da microflora associada a sementes de feijão e soja no meio NEON	41
5.4 CONCLUSÕES	47
5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	50

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Percentagem de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em sementes de feijão artificialmente inoculadas, por diferentes tempos de exposição à colônia dos diversos isolados, determinada pela incubação em Papel de Filtro ("Blotter test"). UFLA, Lavras - MG, 1996.	20
2	Percentagem de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em sementes de soja artificialmente inoculadas, por diferentes tempos de exposição à colônia dos diversos isolados, determinada pela incubação em Papel de Filtro ("Blotter test"). UFLA, Lavras - MG, 1996.	21
3	Percentagem de <i>S.sclerotiorum</i> em sementes de feijão e soja, inoculadas com os diferentes isolados e determinadas pelo meio NEON, sob duas temperaturas de incubação. UFLA, Lavras - MG, 1996	34
4	Percentagem de <i>S.sclerotiorum</i> em sementes de feijão e soja, inoculadas com diferentes isolados e determinadas pelo método de incubação em Papel de Filtro impregnado com meio NEON, sob duas temperaturas. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	35
5	Percentagem de <i>S.sclerotiorum</i> em sementes de feijão e soja, inoculadas com os diferentes isolados e determinadas pelo método de incubação em Papel de Filtro impregnado com meio ágar/água acrescido de azul de bromofenol, sob duas temperaturas. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	35
6	Percentagem de <i>S.sclerotiorum</i> em sementes de feijão e soja, inoculadas com os diferentes isolados e determinadas pelo método de incubação em Papel de Filtro impregnado com meio ágar/água acrescido de azul de bromofenol, sob duas temperaturas (sementes cobertas com papel de filtro). UFLA, Lavras - MG, 1996.	36

Tabela	Página
7 Percentagem de <i>S.sclerotiorum</i> em sementes de feijão e soja, inoculadas com os diferentes isolados e determinadas pelo meio ágar/água acrescido de azul de bromofenol, sob duas temperaturas. UFLA, Lavras - MG, 1996.	36
8 Comportamento dos fungos no meio NEON à 14°C. UFLA, Lavras - MG, 1996	43
9 Comportamento dos fungos no meio NEON à 20°C. UFLA, Lavras - MG, 1996	44
10 Comportamento de bactérias no meio NEON à 30°C. UFLA, Lavras - MG, 1996	45

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Sementes de feijão mostrando coloração amarela produzida por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> no meio NEON.	42
2	Cultura pura de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e sementes de feijão mostrando mudança na coloração do meio NEON.	42

RESUMO

PERES, Ângela Pimenta. **Detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e soja (*Glycine max* (L.) Merrill): desenvolvimento de metodologias** Lavras: UFLA, 1996. 51p. (Dissertação - Mestrado em Fitossanidade).

A parte inicial deste estudo consistiu do desenvolvimento de uma metodologia para inocular *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão e soja para obter sementes infectadas tendo em vista o desenvolvimento de um método mais seguro e rápido de detecção desse patógeno em sementes. Utilizou-se 4 isolados de diferentes regiões de cultivo, que foram inoculados nas sementes pelo contato das sementes com as colônias do fungo em desenvolvimento por 18, 24 e 30 horas. As sementes inoculadas foram submetidas ao "Blotter test", sob temperaturas de incubação de 14 e 20°C no escuro, por 7 dias. Os resultados do teste mostraram que o período de 30 horas de exposição às colônias fúngicas foi suficiente para obtenção de sementes infectadas com o patógeno, sendo a temperatura de incubação de 20°C eficiente para o seu desenvolvimento. Na etapa seguinte deste trabalho estudou-se a viabilidade de utilização de substratos semi-seletivos para detectar *S.sclerotiorum* em sementes. Foi testado o meio NEON (150 mg de azul de bromofenol, 150 mg de

* Orientador: Luiz Carlos Bhering Nasser. Membros da Banca: José da Cruz Machado e Mário Sobral de Abreu

penicilina G e 150 mg de sulfato de estreptomicina/1 litro de BDA), com modificações sob duas temperaturas, 14 e 20°C, por 7 dias, no escuro. Considerou-se portadoras de *S.sclerotiorum* as sementes ao redor das quais se observou mudança de coloração do meio, de azul para amarelo claro e produção de escleródios próximo às mesmas. Os resultados indicaram que o meio NEON sob essas condições pode constituir-se em um método alternativo para a detecção de *S.sclerotiorum*, em sementes de feijão e soja. Foi observada mudança de coloração do meio por outros microrganismos, porém pelas observações morfológicas das colônias os mesmos foram facilmente diferenciados de *S.sclerotiorum*.

ABSTRACT

DETECTION OF *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary ON SEEDS OF BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) AND SOYBEAN (*Glycine max* (L.) Merrill): DEVELOPMENT OF METHODOLOGIES.

The first part of this study consisted of the establishment of a methodology for inoculating *Sclerotinia sclerotiorum* into seeds of bean and soybean to obtain infected seeds, having in sight the development of a safer and faster method to detect this pathogen in seeds. Four isolates from different growing regions, were inoculated in seeds by contact of the seeds with the developing colonies of the fungi for 18, 24 and 30 hours. The inoculated seeds were submitted to "Blotter test" under incubation temperatures of 14 and 20°C in the dark, for 7 days. The results of the test showed that the 30 hours period of exposition to the fungal colonies was enough to obtain seeds infected by the pathogen, being the incubation temperature of 20°C efficient for its development. In the following step of this work, the feasibility of utilizing semi selective substrates to detect *S.sclerotiorum* in seeds was investigated. The NEON medium (150 mg of bromophenol blue, 150 mg of penicillin G and 150 mg of streptomycin sulphate/ 1 liter of BDA) with modifications under two temperatures, 14 and 20°C for 7 days in the dark, were studied. In seeds where around change of the colour of the medium from blue to light yellow was observed and sclerotia were produced, were considered to harbour *S.sclerotiorum*. The results indicated that the NEON medium under these conditions, may come to be an alternative method for detection of *S.sclerotiorum*, in

seeds of bean and soybean. Colour changes of the medium by other microorganisms were also observed but morphological observations of the colonies, make them to be easily distinguished from *S.sclerotiorum*.

1 INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, a produção média anual de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), está em torno de 3,3 milhões de toneladas e produtividade média ao redor de 610 kg/ha (IBGE,1994). Trata-se de uma produtividade baixa, considerando-se que o feijoeiro tem potencial para produzir mais de 4.000 kg de grãos secos/ha e algumas variedades atuais de sequeiro, usadas sob pivô central, podem alcançar até 5.000 Kg/ha. Quanto à soja (*Glycine max* (L.) Merrill), apesar de o Brasil estar entre os maiores produtores mundiais, a produtividade dessa cultura ainda é baixa, 2.000 Kg/ha, sendo inferior a da Argentina, geograficamente, seu concorrente mais próximo.

Entre os principais fatores que limitam o cultivo dessas culturas estão a alta suscetibilidade a doenças e o uso de sementes de má qualidade.

As sementes de feijão e de soja podem transmitir de forma muito eficiente inúmeros fungos causadores de doenças, que podem provocar danos diretos às plantações como redução do estande, debilitação das plantas, alterações visuais e tornar-se fontes de inóculo primário para o desenvolvimento de doenças.

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary é um patógeno de solo que pode ser transmitido por sementes de um grande número de plantas, causando a

doença conhecida como “podridão de esclerotínia” ou “mofo branco”. A queda do rendimento do feijão provocada pelo mofo branco tem sido das mais elevadas no Brasil a partir da década de 80, com o aumento da área irrigada com feijão, principalmente nos cerrados, onde os restos de cultura da soja contaminada com o patógeno tem servido como fonte de inóculo para o feijão. Por ser um patógeno que pode permanecer viável no solo por mais de cinco anos, mesmo na ausência de hospedeiros, uma das medidas de controle eficiente e econômica é o uso de sementes sadias.

Os testes de sanidade têm como fundamento evidenciar os patógenos que estejam associados às sementes, permitindo ao analista a sua identificação rápida e segura. De acordo com Brasil (1992) o teste de sanidade recomendado para a detecção de *S.sclerotiorum* em sementes de feijão e soja é o método do papel de filtro (“Blotter Test”), com 30 dias de incubação à temperatura de 5 a 7°C, sob escuro contínuo. Entretanto, segundo Machado (1988), é recomendável ainda o exame da fração impura, separada no teste de pureza, composta de fragmentos vegetais, pedaços de sementes, escleródios, etc. Este material que também é levado ao campo por ocasião da semeadura, constitui um risco potencial na introdução do referido patógeno em áreas de cultivo.

Atualmente, com a exigência de nível zero de tolerância em proposição no Brasil, para *S.sclerotiorum* em sementes básicas e certificadas de feijão e soja (Machado, 1994), o volume de amostras para análise tem aumentado consideravelmente exigindo por conseguinte, resultados mais rápidos e precisos nas análises de laboratório. Devido ao longo período de incubação das sementes e eficiência duvidosa na detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja e

feijão, faz-se necessário o desenvolvimento de uma metodologia mais rápida, precisa e econômica, preenchendo todos os requisitos de um teste de sanidade eficiente, prático e seguro.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary (Syn=*Whetzelinia sclerotiorum*), é um fungo pertencente à subdivisão Ascomycotina, classe Discomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae (Korf, 1973). É um fungo polífago, de distribuição mundial, sendo o agente causal da “podridão de esclerotínia” ou “murcha de esclerotínia”, ou ainda, “mofo-branco”.

Boland e Hall (1994), reportam a ocorrência de 408 espécies pertencentes a 75 famílias de plantas suscetíveis à *S.sclerotiorum*. Purdy (1979) cita este fungo como sendo o mais onívoro, inespecífico e bem sucedido dos fitopatógenos. No Brasil, segundo Chaves (1964), o primeiro registro de ocorrência de *S.sclerotiorum* foi feito em 1921 por Saccá, que verificou o patógeno sobre *Solanum tuberosum* L., no Estado de São Paulo. O patógeno é encontrado atualmente em várias espécies cultivadas como tomate, amendoim (Galli et al., 1980), alface, batatinha, colza, girassol, soja, tremoço (Homechin, 1982), feijão (Santos e Athayde, 1983), e ervilha (Café Filho, 1985), bem como em algumas plantas daninhas (Chaves, 1964).

S.sclerotiorum é um organismo de solo que pode ser transmitido por sementes, através do micélio aderido ou escleródios misturados às mesmas (Ferreira, Lehman e Almeida, 1981; Sinclair, 1975); podendo sobreviver em sementes infectadas

como micélio dormente no tegumento e nos cotilédones por 3 anos ou mais (Tu, 1988). Segundo Tu, 1988, os escleródios produzidos em plantas infectadas são as estruturas de perpetuação do fungo no solo, onde podem sobreviver por 6 a 8 anos. Da germinação dos escleródios aparecem os apotécios, onde são produzidos os ascosporos, ou ocorrer a formação de micélio. Segundo Steadman (1983), quando os ascosporos estão maduros dentro do apotécio, uma diminuição da umidade relativa do ar provoca-lhes a liberação por ejeção. Os ascosporos ejetados acima do dossel das plantas podem ser transportados pelo vento a quilômetros (Abawi e Grogan, citados por Tu, 1989), constituindo um risco de infecção para as lavouras mais próximas.

Segundo trabalhos de Grogan e Abawi, (1975), Reis (1975), Sinclair (1975) e Yorinori (1982), temperaturas abaixo de 20°C favorecem a sobrevivência dos escleródios, e temperaturas de 10 à 20°C, associadas com umidades saturadas ou próximas à saturação e presença de matéria orgânica, favorecem a produção de apotécios, sendo que, acima de 30°C e abaixo de 5°C, a doença não aparece. Segundo Chupp e Sherf; citados por Willets e Wong, (1980), *Sclerotinia* spp. pode infectar hospedeiros numa faixa de temperatura de 0 a 25°C, com ótimo entre 15 e 20°C. A severidade da doença é acentuada por plantios de alta densidade, períodos prolongados de alta umidade e baixas temperaturas, de acordo com Homechin (1982), Yorinori (1982) e Santos e Athayde (1983).

Steadman (1983), afirma que *S.sclerotiorum* requer uma fonte exógena de energia para que os ascosporos infectem as plantas, e essa energia pode ser provida por órgãos injuriados ou senescentes. No feijão, a fonte mais frequente de energia são

as flores velhas que ficam presas às vagens ou depositadas sobre algum órgão da planta ou no solo. Período de umidade de 48-72 horas é necessário para o estabelecimento da infecção e expansão da lesão, indicando que a umidade é um fator importante para o desenvolvimento do fungo. Infecções secundárias ocorrem pelo contato natural de partes sadias da planta com partes doentes (Tu, 1989).

Sutton e Deverall (1983), estudando o processo de infecção de tecidos de feijão por ascosporos concluíram que na ausência de nutrientes exógenos os ascosporos produzem pequenos tubos germinativos sobre os tecidos intactos, mas apenas os tecidos jovens são penetrados por hifas originadas da germinação desses esporos. Segundo Abawi e Grogan (1979), sem condições adequadas de umidade e sem uma fonte de energia, os ascosporos podem sobreviver por até 12 dias sobre tecidos do feijoeiro.

No processo de patogênese por *S.sclerotiorum* são secretadas enzimas pectinolíticas e ácido oxálico (Bateman e Millar, 1966; Hancock, 1966; Lumsden, 1976; Maxwell e Lumsden, 1970; Lumsden, 1979; Noyes e Hancock, 1981; Punja, Huang e Jenkins, 1985), importantes na degradação da lamela média que une as células. Segundo Bateman e Millar (1966), a ação do ácido oxálico e enzimas pectinolíticas parece ser sinérgica, com o ácido favorecendo a ação das enzimas devido a um abaixamento de pH dos tecidos, permitindo o avanço do micélio fúngico. Tu (1989) concluiu que o ácido oxálico altera a membrana dos cloroplastos e a membrana plasmática. Segundo Lumsden (1979) a produção de ácido oxálico por *S.sclerotiorum* é responsável por um abaixamento de pH, facilitando a ação das enzimas pectinolíticas,

durante o processo de patogênese. Este autor afirma que o referido ácido é um forte agente quelante de cálcio e outros cátions, assim ele se liga com os cátions mono e divalentes, inibidores da maceração dos tecidos, causando os sintomas da doença. Noyes e Hancock (1981) em estudos com murcha de girassol causada por *S.sclerotiorum* sugeriram que este ácido, agindo como uma toxina móvel, causa a síndrome de murcha e os dados comprovam que o abaixamento do pH não é o único responsável pela doença.

Celulases e hemicelulases são enzimas que frequentemente têm sido associadas com *Sclerotinia* spp e o processo de patogênese (Hancock, 1967; Lumsden, 1969), indicando que o patógeno parece ter um completo sistema que utiliza formas insolúveis de celulose como fonte de energia, ao contrário de outros fungos que conseguem aproveitar apenas os seus derivados. Ao lado das enzimas degradadoras da parede celular, fosfatase B é produzida por *S.sclerotiorum* com a função de hidrolizar os componentes fosfatos das membranas celulares. A atividade de enzimas proteolíticas, potencialmente responsáveis pela degradação do protoplasma do hospedeiro e possivelmente dos constituintes da parede celular, foi também detectada em culturas e tecidos infectados por *S.sclerotiorum* (Khare e Bompeix, 1976). Trabalhos de Tariq e Jeffries (1987), demonstram a atividade de enzimas lipolíticas durante a penetração no hospedeiro por *S.sclerotiorum*, afirmando que essas enzimas podem amaciar a cutícula ou dissolvê-la completamente em uma dada região, removendo a sua permeabilidade, facilitando a penetração do patógeno no hospedeiro.

A doença se manifesta na haste, folhas e vagens, começando geralmente pelas partes mais próximas do solo, na forma de manchas aquosas que evoluem para podridão mole. Tecidos assim afetados são cobertos pelo crescimento micelial branco do patógeno que, gradualmente, forma massas compactas, inicialmente claras e finalmente pretas, de dimensões variáveis, visíveis a olho nu; os escleródios. Dependendo do local e da extensão da necrose a planta pode amarelecer e morrer (Galli et al., 1980).

O controle da doença é fundamentado por um conjunto de práticas culturais e pulverizações químicas, porém segundo Tu (1989) a maioria das doenças causadas por *Sclerotinia* spp. não tem sido constante e economicamente controladas. Entre os métodos de controle, uma das melhores medidas atualmente é evitar a entrada do patógeno na área, utilizando sementes sadias ou tratadas. No momento, há a carência de uma metodologia para a detecção de *S.sclerotiorum* em amostras de sementes de soja e feijão que forneça resultados seguros em um curto período de tempo.

Segundo Brasil (1992), para se detectar esse patógeno é necessário incubação das sementes por 30 dias à temperatura de 5 a 7°C, sob escuro contínuo. Algumas tentativas têm sido colocadas em prática por alguns pesquisadores brasileiros no sentido de se estabelecer uma metodologia capaz de detectar em tempo hábil e de forma mais segura a presença ou não de *S.sclerotiorum* em sementes. Koch, Moraes e Menten (1995) concluíram que a incubação de sementes em 3 folhas de papel de filtro bem úmidas, a uma temperatura de 15-17°C e escuro total por 14 dias, é um método que potencialmente pode ser empregado nas análises de rotina objetivando a detecção

desse fitopatígeno em sementes de feijão. O método do rolo de papel para a avaliação da sanidade em sementes certificadas de feijão detectou a presença de *S.sclerotiorum*, de acordo com Patrício et al.(1995), onde 400 sementes foram colocadas em rolos de papel umedecidos e mantidas por 7 dias a 20°C, sob escuro com exame adicional das sementes e plântulas mortas ou manchadas após incubação de 2-3 dias. Nasser, Boland e Sutton (1995) relatam a potencialidade de um meio, denominado “Meio NEON” na detecção de *S.sclerotiorum* em sementes. Este meio, à base de B.D.A. e azul de bromofenol, tem como fundamento a mudança de coloração do mesmo na presença de micélio fúngico de *S.sclerotiorum* nas sementes. Segundo o primeiro autor (1994, comunicação pessoal), este fungo produz ácido oxálico que em reação com os componentes do meio NEON muda a sua coloração devido a um abaixamento de pH, indicando visualmente em cerca de 5 a 7 dias, a uma temperatura de incubação de 16 a 18°C, a presença ou não do fungo em referência, nas sementes.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAWI, G.S.; GROGAN, R.G. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, St. Paul, v.69, n.8, p.899-903, Aug., 1979.
- BATEMAN, D. F. e MILLAR, R. L. Petic enzymes in tissue degradation. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.4, p 119-146, 1966.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ghelph, v.16, n.2, p.93-108, 1994.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, 1992. 365p.
- CAFÉ FILHO, A.C. Alerta aos produtores de ervilha - podridão de *Sclerotinia*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.3, n.1, p.57, maio, 1985.
- CHAVES, G.M. Estudos sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Experimentiae**, Viçosa, v.4, n.2, p.69-133, nov., 1964.
- FERREIRA, L.P.; LEHMAN, P.S.; ALMEIDA, A.M.R. Moléstias e seu controle. In: MYASAKA, A.; MEDINA, J.C. **A soja no Brasil**, Campinas: ITAL, 1981. p.603-639.
- FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Anuário Estatístico do Brasil** . Rio de Janeiro, 1994. v.60, 856p.
- GALLI, F.; TOKESHI, H.; CARVALHO, P.C.; BALMER, E.; KIMATI, H.; CARDOSO, C.O.N.; SALGADO, C.L. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, 1980.v.2, 587p.
- GROGAN, R.G.; ABAWI, G.S. Influence of water potencial on growth and survival of *Whetzelinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, St. Paul, v.65, n.2, p.122-128, Feb., 1975.

- HANCOCK, J. G. Hemicellulose degradation in sunflower hypocotyls infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, St. Paul, v.57, p.203-206, 1967.
- HANCOCK, J. G. Degradation of pectic substances associated with pathogenesis by *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower and tomato stems. **Phytopathology**, St. Paul, v.56, n.8, p.975-979, 1966.
- HOMECHIN, M. Situação atual da ocorrência de podridão de esclerotínia causada por *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.7, n.3, p.476, out. 1982.
- KHARE, K. B., e BOMPEIX, G. Activities proteolytiques des *Sclerotinia sclerotiorum* et *S. minor*. role possible lors de la pathogenese. **Review of Mycology**, Paris, v.40, p.65-84, 1976.
- KOCH, E.F.A.; MORAES, M.H.D.; MENTEN, E.J.O. Metodologia para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 18, Piracicaba, 1995. **Resumos...**Piracicaba: Grupo Paulista de Fitopatologia, 1995.
- KORF, R.P. Discomycetes and Tuberales. In: AINSWORTH, G.; SUSSMAN, A.S. **The fungi, and advanced treatise**. New york: Academic Press, 1973. v.4A, p.249-319.
- LUMSDEN, R. D. Histology and physiology of pathogenesis in plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, St. Paul, v.69, n.8, p.890-896, Aug., 1979.
- LUMSDEN, R. D. Pectolytic enzymes of *Sclerotinia sclerotiorum* and their localization in infected bean. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.54, n.23, p.2630-2641, Dec., 1976.
- LUMSDEN, R. D. *Sclerotinia sclerotiorum* infection of bean and the production of cellulase. **Phytopathology**, St. Paul, v.59, n.5, p. 653-657, May, 1969.
- MACHADO, J. C. **Patologia de Sementes; fundamentos e aplicações**. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE, 1988. 107p.
- MACHADO, J. C. Padrões de tolerância de patógenos associados à sementes. In: LUZ, W. C.; ed. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**: Passo Fundo, v.2, 1994. p.229-263.
- MAXWELL, D. P. e LUMSDEN, R. D. Oxalic acid production by *Sclerotinia sclerotiorum* in infected bean and in culture. **Phytopathology**, St. Paul, v.60, n.9, p.1395-1398, Sept., 1970.

- NASSER, L. C. B.; BOLAND, G. J.; SUTTON, J. C. Meio de cultura semi-seletivo para detecção da viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 28, Ilhéus, 1995. **Resumos...** Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1995. p.376.
- NOYES, R. D. e HANCOCK, J. G. Role of oxalic acid in the *Sclerotinia* wilt of sunflower. **Physiological Plant Pathology**, London, v.18, p.123-132, 1981.
- PATRÍCIO, F.R.A.; NETO, M.L.; BARROS, L.C.S.; ATALLA, L.M.P.; PIANOSKI, J.; FERREIRA, M.L.; BASTOS, T.M. Qualidade sanitária de sementes certificadas de feijão produzidas no estado de São Paulo em 1994. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 18, Piracicaba, 1995. **Resumos...** Piracicaba: Grupo Paulista de Fitopatologia, 1995.
- PUNJA, Z. K., HUANG, J.S. e JENKINS, S. F. Relationship of mycelial growth and production of oxalic acid and cell wall degrading enzymes to virulence in *Sclerotium rolfsii*. **Canadian Journal Plant Pathology**, Guelph, v.7, p.109-117, 1985.
- PURDY, L.H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geografic distribution and impact. **Phytopathology**, St. Paul, v.69, n.8, p.875-880, Aug., 1979.
- REIS, E.M. A "podridão da haste" da soja. **Lavoura Arrozeira**, Porto Alegre, v.28, n.287, p.32-36, set., 1975.
- SANTOS, A.F.; ATHAYDE, J.T. Incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) na região serrana do Estado do Espírito Santo. **Revista Ceres**, Viçosa, v.30, n.169, p.242-244, maio/jun., 1983.
- SINCLAIR, J.B. (ed.) **Compendium of soybean diseases**. Minnesota: American Phytopathological Society, 1975. 69p.
- STEADMAN, J.R. White mold - a serious yield-limiting disease of bean. **Plant Disease**, Beatsville, v.67, p.346-350, 1983.
- SUTTON, D.C.; DEVERAL, B.J. Studies on infection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max*) by ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, Oxford, v.32, n.3, p.251-261, Sept., 1983.
- TARIQ, V.-N., e JEFFRIES. Cytochemical localization of lipolytic enzyme activity during penetration of host tissues by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.30, London, p.77-91, 1987.

- TU, J.C. Management of white mold of white beans in Ontario. **Plant Disease**, Beatsville, v.73, p.281-285, 1989.
- TU, J.C. The role of white mold-infected white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed in the dissemination of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v.121, p.40-50, 1988.
- WILLETS, H.J.; WONG, J.A.L. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifolium* and, *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. **The Botanical Review**, Bronx, v.46, n.2, p.101-165, May, 1980.
- YORINORI, J.T. Doenças da soja causadas por fungos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.8, n.94, p.40-46, out., 1982.

4 CAPÍTULO I

OBTENÇÃO DE SEMENTES DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.) E SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill) INFECTADAS COM *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary

RESUMO

O desenvolvimento de métodos de inoculação de sementes de feijão e soja com *Sclerotinia sclerotiorum* é de grande importância para diversos estudos, incluindo a detecção desse patógeno. No presente trabalho objetivou-se estudar o desenvolvimento de uma metodologia de inoculação de *S.sclerotiorum* em sementes de feijão e soja que torne fácil e eficiente a obtenção de sementes infectadas dessas espécies com o referido fungo. Foram utilizados 4 isolados cujas colônias foram cultivadas independentemente em meio BDA, sobre as quais as sementes foram mantidas em contato por 18, 24 e 30 horas, em câmara à 20°C. As sementes foram em seguida submetidas ao "Blotter test", sendo metade desinfestada superficialmente com hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos. Foram testadas temperaturas de incubação de 14 e 20°C, no escuro, por 7 dias, seguindo desta forma as condições recomendadas para o teste de sanidade em análises de rotina. Cada isolado foi analisado individualmente e os resultados mostraram que, para a maioria dos isolados, a exposição das sementes às colônias do fungo por 30 horas é suficiente e necessária

para obtenção de sementes infectadas com o patógeno; sendo a câmara de 20°C adequada para o desenvolvimento de *S.sclerotiorum*.

ABSTRACT

OBTAINTION OF BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) AND SOYBEAN (*Glycine max* (L.) Merrill) SEEDS INFECTED WITH *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary

The development of inoculation methods for bean and soybean seeds with *Sclerotinia sclerotiorum* is of great importance to several studies, including the detection of this pathogen. In the present work, the development of an inoculation methodology for *S.sclerotiorum* on bean and soybean seeds that makes easy and effective the obtaintion of infected seeds was the objetive. Four isolates were grown in separete on PDA medium, on which the seeds were kept in contact for 18, 24 and 30 hours in a chamber at 20°C. The seeds were submitted, afterwards, to the "Blotter test", being half surface-desinfested with 1% sodium hypochloride for five minutes. Incubation temperatures from 14 to 20°C, in the dark, for 7 days were tested, following the conditions recomendaded for the seed heath testing in routine analysis. Each isolate was analyzed individually and the results showed that, for most isolates, exposition of seeds to the fungal colonies for 30 hours was enough and required for obtaining seeds infected with the pathogen; being the 20°C temperature, adequate for the development of the *Sclerotinia sclerotiorum*.

4.1 INTRODUÇÃO

Sclerotinia sclerotiorum é um patógeno de solo que pode ser transmitido por sementes sendo o causador do “mofo branco” ou “podridão de esclerotínia”, doença que vem ocasionando perdas elevadas em lavouras de soja e, principalmente, de feijão irrigado. Esse fungo pode ser transmitido pelas sementes através do micélio aderido ou escleródios misturados às mesmas, podendo sobreviver como micélio dormente na testa e cotilédones por 3 anos ou mais (Tu, 1988).

A disponibilidade de sementes contaminadas ou infectadas com determinados patógenos de ocorrência mais rara nestas circunstâncias é uma preocupação que se tem para diversas finalidades. Para patógenos como *S.sclerotiorum*, *Diaporthe phaseolorum* f sp *meridionalis*, *Fusarium oxysporum*, *Diplodia maydis*, *Colletotrichum lindemuthianum*, entre outros, que ocorrem em baixos níveis em sementes de seus hospedeiros, o uso de sementes com taxas razoavelmente mais elevadas faz-se necessário, em se tratando de estudos visando o desenvolvimento de metodologias de detecção, tratamentos de sementes e aspectos epidemiológicos das doenças que causam.

De um modo geral a ocorrência de *S.sclerotiorum* em amostras de sementes de feijão e soja é relativamente baixa, raramente ultrapassando o índice de 2%. Isto faz com que trabalhos que dependam da disponibilidade de amostras com índices mais elevados, tendo em vista a investigação de certos efeitos, sejam dificultados.

A obtenção de sementes infectadas pode ser alcançada através de inoculação artificial. Estudos com sementes de algodão inoculadas artificialmente com

Colletotrichum gossypii e *Botryodiplodia theobromae* mostraram que a exposição das sementes sobre as colônias do fungo é eficiente para a obtenção de sementes infectadas com alta taxa desses patógenos (Tanaka, 1990; Oliveira, 1994). Machado (1996, comunicação pessoal) afirma que metodologias baseadas neste mesmo princípio têm sido utilizadas para a inoculação de sementes de feijão e soja com *Rhizoctonia solani* em estudos de fungicidas visando o tratamento de sementes.

Este trabalho teve como objetivo, desenvolver uma metodologia eficiente de inoculação de *S.sclerotiorum* em sementes de feijão e soja, visando a infecção das mesmas tornando possível estudos posteriores de detecção do mesmo.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal de Lavras M.G. Utilizaram-se amostras de sementes de feijão, cultivar Carioca, procedentes do Estado de São Paulo, safra 1995, e amostras de sementes de soja da variedade Cristalina, procedentes do Estado de Goiás, safra 1994-1995. Ambas as amostras com nível 0% de ocorrência de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Os isolados de *S.sclerotiorum*, em número de quatro, foram obtidos a partir de amostras de sementes de feijão procedentes de diferentes regiões de cultivo: dois isolados (O e L) foram obtidos a partir de escleródios procedentes de lotes de sementes da região norte e sul do estado de Minas Gerais, respectivamente, um isolado (H) da região nordeste do estado de São Paulo; e o outro (C-19) foi obtido junto

à micoteca do Laboratório de Patologia de Sementes da UFLA, sendo o mesmo de procedência de São Gotardo, região do Alto Paranaíba, M.G.

4.2.1 Obtenção dos isolados em cultura pura

Os escleródios da fração impura dos lotes de sementes foram desinfestados superficialmente com solução de hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos, lavados três vezes em água destilada esterilizada e transferidos para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio BDA (200g de batata, 20 g de ágar purificado-Merck e 20 g de dextrose/l). As placas foram incubadas em câmara com temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ no escuro, por 7 dias; período em que ocorreu o desenvolvimento miceliogênico oriundo dos escleródios. Discos de 5 mm de diâmetro retirados das margens destas colônias foram transferidos para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio BDA, e incubadas nas mesmas condições anteriormente descritas por um período de 5 a 7 dias, obtendo-se desta forma as culturas puras.

4.2.2 Padronização da metodologia de inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão e soja

De cada isolado obtido, crescido em BDA, foram retirados discos de 15 mm de diâmetro das extremidades das colônias e transferidos para o centro de placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo meio BDA. Essas placas foram incubadas por 7 dias em câmara com temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro. Após esse período de incubação, em câmara asséptica, fez-se a rolagem das sementes sobre as colônias do

fungo em desenvolvimento permanecendo aí incubadas por 18, 24 e 30 horas em câmara, nas condições descritas anteriormente. Ao serem deixadas sobre as colônias de *S.sclerotiorum*, as sementes foram dispostas em uma única camada ocupando a superfície das colônias no meio BDA, contido nas placas de Petri. Tanto para sementes de feijão quanto para sementes de soja, duzentas sementes foram inoculadas. Após a inoculação, metade das sementes foi submetida ao tratamento com hipoclorito de sódio 1% durante 5 minutos, seguido de lavagem por duas vezes em água destilada esterilizada e secagem sobre papel de filtro em câmara de fluxo laminar por no máximo 10 minutos. A testemunha constou de sementes roladas e incubadas em meio BDA sem o fungo. Posteriormente, as sementes foram submetidas ao teste de sanidade em papel de filtro ("Blotter test") sendo incubadas sob temperaturas de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $14\pm 2^{\circ}\text{C}$, por 7 dias, ambas no escuro.

Cada parcela experimental foi constituída por uma caixa "gerbox" contendo 25 sementes dispostas equidistantemente sobre duas folhas de papel mata-borrão umedecidas em água destilada esterilizada. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Cada isolado foi analisado individualmente, utilizando-se o esquema fatorial, com 3 tempos de inoculação x 2 temperaturas de incubação, para cada tratamento de desinfestação superficial. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, após transformação por $\log(x + 10)$.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos se encontram nas Tabelas 1 e 2.

TABELA 1. Percentagem de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão artificialmente inoculadas, por diferentes tempos de exposição à colônia dos diversos isolados, determinada pela incubação em Papel de Filtro ("Blotter test"). UFLA, Lavras - MG, 1996.

ISOLADOS (Ref.)	TEMPO INOCULAÇÃO (Horas)	TEMPERATURAS INCUBAÇÃO		C.V.(%)
		14°C	20°C	
SEMENTES SEM DESINFESTAÇÃO SUPERFICIAL				
C-19	18	0,000	0,000	0,843
	24	0,000	0,000	
	30	0,000	0,000	
H	18	0,000 a A	0,000 b A	4,355
	24	0,000 a A	3,510 b A	
	30	2,963 a A	31,039 a A	
L	18	0,000 b A	0,000 b A	5,600
	24	0,000 b B	17,344 a A	
	30	16,901 a A	11,323 a A	
O	18	0,000 ns	0,000 ns	5,167
	24	0,000 ns	1,865 ns	
	30	0,000 ns	7,448 ns	
Testemunha	18	0,000	0,000	
	24	0,000	0,000	
	30	0,000	0,000	
SEMENTES DESINFESTADAS SUPERFICIALMENTE				
C-19	18	0,000	0,000	0,843
	24	0,000	0,000	
	30	0,000	0,000	
H	18	0,000 a A	0,000 b A	2,809
	24	0,964 a A	0,000 b A	
	30	0,964 a B	8,592 a A	
L	18	0,000 ns	0,000 ns	2,986
	24	0,000 ns	0,000 ns	
	30	4,796 ns	2,711 ns	
O	18	0,000 ns	2,874 ns	2,850
	24	0,000 ns	0,000 ns	
	30	4,967 ns	2,711 ns	
Testemunha	18	0,000	0,000	
	24	0,000	0,000	
	30	0,000	0,000	

Médias seguidas por mesma letra maiúscula entre colunas e minúscula entre linhas não diferem entre si pelo teste de Tuckey à 5% de probabilidade.

TABELA 2. Percentagem de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja artificialmente inoculadas, por diferentes tempos de exposição à colônia dos diversos isolados, determinada pela incubação em Papel de Filtro ("Blotter test"). UFLA, Lavras - MG, 1996.

ISOLADOS (Ref.)	TEMPO INOCULAÇÃO (Horas)	TEMPERATURAS INCUBAÇÃO		C.V.(%)
		14°C	20°C	
SEMENTES SEM DESINFESTAÇÃO SUPERFICIAL				
C-19	18	12,972 c B	91,848 a A	1,213
	24	66,836 b B	99,996 a A	
	30	95,940 a A	98,988 a A	
H	18	27,605 c B	93,860 a A	3,008
	24	53,800 b B	97,984 a A	
	30	74,736 a B	98,988 a A	
L	18	28,144 ns	79,896 ns	9,365
	24	23,996 ns	61,616 ns	
	30	96,988 ns	94,896 ns	
O	18	7,580 b B	70,912 b A	3,661
	24	42,832 a B	99,996 a A	
	30	42,612 a B	85,408 abA	
Testemunha	18	0,000	0,000	
	24	0,000	0,000	
	30	0,000	0,000	
SEMENTES DESINFESTADAS SUPERFICIALMENTE				
C-19	18	1,865 b B	17,965 c A	4,410
	24	3,908 b B	60,540 b A	
	30	60,512 a B	94,832 a A	
H	18	1,952 b A	10,880 b A	4,656
	24	11,779 b B	71,580 a A	
	30	46,136 a B	99,996 a A	
L	18	9,872 ns	18,220 ns	6,003
	24	43,728 ns	92,864 ns	
	30	54,940 ns	97,984 ns	
O	18	0,964 ns	9,890 ns	6,673
	24	20,668 ns	10,115 ns	
	30	35,340 ns	76,440 ns	
Testemunha	18	0,000	0,000	
	24	0,000	0,000	
	30	0,000	0,000	

Médias seguidas por mesma letra maiúscula entre colunas e minúscula entre linhas não diferem entre si pelo teste de Tuckey à 5% de probabilidade.

Os resultados mostram que houve uma variação dos níveis de inóculo entre as sementes inoculadas com os diversos isolados.

O isolado C-19 em certas circunstâncias, por não produzir consistentemente escleródios, tornava a avaliação difícil, uma vez que a mesma foi baseada apenas na presença ou ausência dessas estruturas próximas às sementes. Este fato poderia ser explicado, entre outras causas, pela ocorrência, quando da inoculação, da fase denominada "espermacial", em que ocorre uma fragmentação das hifas do fungo (Mordue e Holliday, 1976) e paralisação temporária na formação de escleródios.

Pelos resultados observa-se que uma maior eficiência da inoculação foi obtida nas sementes de soja, com todos os isolados, em relação às sementes de feijão. O maior percentual de incidência do fungo nas sementes de feijão foi de 31%, enquanto as sementes de soja alcançaram níveis de até 100% de infecção. Essa afinidade de alguns isolados por certas espécies pode ser devido a diversos fatores, como a composição química, anatomia e nível de vigor, que são variáveis entre as espécies e variedades.

Diferentes tipos de lipídios são encontrados nas células vegetais: óleos e gorduras, principalmente nas sementes e fosfolipídios e glicolipídios, nas membranas. De acordo com Pascholati (1995) os lipídios são ácidos graxos que podem ser degradados pela ação de enzimas lipolíticas secretadas pelos fungos e utilizados diretamente por esses fitopatógenos como fonte de nutrientes necessários para o crescimento. Segundo Carvalho e Nakagawa (1983) o teor de lipídios em sementes de soja é cerca de dez vezes maior quando comparado à sementes de feijão. Este fato evidencia que provavelmente as sementes de soja sejam mais ricas em nutrientes

requeridos por este fitopatógeno. Entretanto, acredita-se que a anatomia do tegumento das sementes, que em soja parece ser mais sensível a stress hídrico do que sementes de feijão, pode ter sido um dos principais responsáveis pela maior suscetibilidade de soja à *S.sclerotiorum* no presente trabalho.

A incubação das sementes sob temperaturas de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ conseguiu detectar maiores índices de *S.sclerotiorum*, para a maioria dos isolados quando inoculados nas sementes, indicando um maior crescimento micelial e capacidade de formação de escleródios à essa temperatura. Esses dados encontram-se de certa forma em concordância com Abawi e Grogan (1975), pois um maior número de escleródios foi obtido à 25°C quando comparada com temperaturas que variaram entre 10 e 15°C e o maior crescimento micelial à temperaturas que variaram de 20 à 25°C . Segundo Le Tourneau (1979) dependendo do isolado e das condições ambientais, *S.sclerotiorum* cresce e produz escleródios sobre temperaturas que variam de 0 à 30°C . Essa autora afirma que a formação do escleródio exige extensas mudanças celulares e a mobilização e deposição de muitos materiais; sendo que a formação dessas estruturas pode ser uma resposta às mudanças e disponibilidades de nutrientes do meio. Algumas pesquisas suportam essa hipótese, como estudos de Christias e Lockwood (1973) em que a formação de escleródios por *S.sclerotiorum* foi induzida quando o micélio cresceu totalmente no meio de cultura e, conseqüentemente, os nutrientes exauridos.

O período de 30 horas de inoculação, pelos resultados obtidos, pode ser considerado adequado para se conseguir sementes de feijão e soja infectadas com *S.sclerotiorum*. Embora para alguns isolados não tenha havido diferenças significativas entre a exposição das sementes às colônias do fungo por 24 ou 30 horas, o período de

30 horas demonstrou uma maior margem de segurança visando obter sementes infectadas com o patógeno.

4.4 CONCLUSÕES

A inoculação das sementes de feijão através do contato direto das mesmas com a colônia de *Sclerotinia sclerotiorum* por 30 horas submetidas à desinfestação superficial ou não, permitiu uma eficiência variável de zero a 31%, enquanto para as sementes de soja a eficiência foi de 35 à 100%.

A inoculação artificial pode ser considerada eficiente para obtenção de sementes de feijão e soja infectadas com *S.sclerotiorum*.

Temperaturas de incubação de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ revelaram ser adequadas para o desenvolvimento de *S.sclerotiorum*, a partir de sementes inoculadas artificialmente, e submetidas ao método de incubação em Papel de Filtro ("Blotter test").

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAWI, G. S. e GROGAN, R. G. Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, St. Paul, v.65, n.3, p.300-309, Mar, 1975.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção**. Campinas: Fundação Cargill, 1983. 326p.
- CHRISTIAS, C. e LOCKWOOD, J., L. Conservation of mycelial constituents in four sclerotium-forming fungi in nutrient-deprived conditions. **Phytopathology**, St. Paul, v.63, n.5, p.602-605, May, 1973.

- LE TOURNEAU, D. Morphology, cytology, and physiology of *Sclerotinia* species in culture. *Phytopathology*, St. Paul, v.69, n.8, p.887-890, Aug., 1979.
- MOURDE, J. E. M.; HOLLIDAY, P. *Sclerotinia sclerotiorum* (Sclerotial state). **Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria**, London: CMI, 1976. (CMI, 513)
- OLIVEIRA, E. **Aspectos patológicos de *Botryodiplodia theobromae* Pat. em relação a sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)**. Lavras: UFLA, 1994. 127p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).
- PASCHOLATI, S. F. Fitopatógenos: Fitotoxinas e Hormônios. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.365-392.
- TANAKA, M. A. S. **Patogenicidade e transmissão por sementes do agente causal da ramulose do algodoeiro**. Piracicaba: ESALQ, 1990. 111p. (Tese - Doutorado em Fitopatologia).
- TU, J. C. The Role of White Mold-Infected White Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Seeds in the Dissemination of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Journal of Phytopathology*, Berlim, v.121, p.40-50, 1988.

5 CAPÍTULO II

UTILIZAÇÃO DE SUBSTRATOS SEMI-SELETIVOS PARA A DETECÇÃO DE *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, EM SEMENTES DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.) E SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill)

RESUMO

Considerando-se que *Sclerotinia sclerotiorum* produz ácido oxálico e que este modifica a coloração de substratos contendo indicador - azul de bromofenol, estudou-se neste trabalho a viabilidade do emprego deste princípio para detectar o referido patógeno, a partir de sementes de feijão e soja artificialmente infectadas. As sementes foram inoculadas com 4 isolados de *S.sclerotiorum*, das quais, metade, foi desinfestada superficialmente, plaqueadas no meio, denominado NEON, e em meios modificados à partir deste, sendo incubadas à 14 e 20°C, no escuro, por 7 dias. Consideraram-se portadoras de *S.sclerotiorum* as sementes em que se observou mudança de coloração do meio, de azul para amarelo claro; formação de micélio típico e escleródios ao redor das mesmas. Para a maioria dos isolados que foram inoculados nos diferentes meios testados, não houve diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as condições de incubação. Os resultados observados mostram que em temperaturas de

incubação de 14 ou 20°C pode constituir-se em um método alternativo para a detecção segura e rápida de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão e soja.

ABSTRACT

USE OF SEMI-SELEKTIVE SUBSTRATES FOR DETECTION OF

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary ON BEAN

(*Phaseolus vulgaris* L.) AND SOYBEAN (*Glycine max* (L.) Merrill) SEEDS.

Taking into consideration that *Sclerotinia sclerotiorum* yields oxalic acid and that this product modifies the coloration of substrates containing the indicator - bromophenol blue, the viability of the use of this principle to detect this pathogen from artificially infected seeds of bean and soybean, was studied in this work. The seeds were inoculated with four *S.sclerotiorum* isolates; then half of the seeds was surface disinfested, plated in the medium, named NEON, and in modified NEON media with incubation at 14 and 20°C, in the dark, for 7 days. The seeds showing change of colour in the medium, from blue to light yellow, as well as formation of typical mycellium and sclerotia were considered infected or contaminated by *S.sclerotiorum*. To most isolates which were inoculated in the different media tested, there was no significant difference ($P < 0,05$) among the incubation conditions. The results observed in this study show that the NEON medium with incubation temperatures of 14 or 20°C may come to be an alternative method for the reliable and quick detection of *S.sclerotiorum* on seeds of bean and soybean.

5.1 INTRODUÇÃO

Entre os fungos transmitidos por sementes de modo geral, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, causador do “mofo branco” em lavouras irrigadas de feijão e soja, é um dos mais preocupantes, pelas perdas que tem causado nestas circunstâncias.

Uma das medidas de se evitar a introdução de *S.sclerotiorum* em áreas livres do patógeno é o uso de sementes sadias. Atualmente, o teste fitossanitário utilizado para se detectar *S.sclerotiorum* em sementes tem se baseado apenas na presença ou ausência de escleródios no lote, não se considerando, a nível de micélio, o patógeno no interior e exterior das sementes. Além disso, o tempo de incubação demandado para o possível aparecimento do patógeno, de acordo com Brasil (1992) é de 30 dias, sendo considerado inviável para Laboratórios de Sanidade onde o volume de amostras analisadas é grande. Face a este problema são necessários estudos visando encontrar uma metodologia de detecção de *S.sclerotiorum* em sementes que seja viável, mais eficiente, além de econômica.

O uso de meios especiais para detecção de patógenos transmissíveis por sementes são constantemente citados, como por exemplo meios de cultura para detecção de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em sementes de tomate, *F.oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijão, *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* em *Pinnus* sp., *Cercospora kikuchii* e *Diaporthe phaseolorum* em soja (ISTA, 1981).

Baseado na produção de ácido oxálico alguns estudos têm sido feitos, onde se verifica a ocorrência de *S.sclerotiorum* uma vez que o mesmo, ao produzir esse composto, na presença de um indicador no meio, modifica a sua coloração. Germeier, Hedke e Tiedemann (1994) fazem referência ao uso do indicador de pH, verde de bromocresol, acrescido em meio contendo fungicidas, para indicar alguns fitopatógenos produtores de ácidos, concluindo que *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Monilinia laxa* produzem ácidos em abundância. Especificamente para *S.sclerotiorum*, Steadman, Marcinkowska e Rutledge (1994) estudaram um meio semi-seletivo capaz de detectar ascosporos em cerca de 3 dias. Este meio é composto de BDA acrescido de pentacloronitrobenzeno, penicilina, estreptomicina e azul de bromofenol, sendo adicionado anfotericina B com o objetivo de reduzir o crescimento de contaminantes, principalmente membros da família Mucorales. Nasser, Boland e Sutton (1995) indicaram um meio à base de B.D.A. e azul de bromofenol usado para detecção da viabilidade de escleródios de *S.sclerotiorum*, denominado meio NEON, como potencialmente capaz de detectar também esse fungo na forma micelial em sementes.

Tendo em vista a necessidade de se desenvolver uma metodologia mais adequada de detecção de *S.sclerotiorum* em sementes de feijão e soja este trabalho foi desenvolvido, considerando-se a incorporação do meio NEON como parte do substrato já empregado em testes de sanidade para o referido fungo.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio NEON com modificações

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal de Lavras M.G. utilizando-se amostras de sementes de feijão, cultivar Carioca, procedentes do estado de São Paulo, safra 1995; e amostras de sementes de soja da variedade Cristalina, procedentes do Estado de Goiás, safra 1994 -1995.

Os isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*, em número de quatro, foram obtidos conforme metodologia descrita no Capítulo I.

As culturas foram obtidas em placas de Petri de 15 cm de diâmetro contendo meio BDA por 7 dias em câmara de incubação com temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro. Após esse período, em câmara asséptica, fez-se a rolagem das sementes sobre as colônias do fungo em desenvolvimento e a incubação da placa contendo as sementes por 30 horas em câmara, nas condições anteriormente descritas. A testemunha constou de sementes roladas e incubadas em meio BDA esterilizado.

Cento e sessenta sementes de feijão e soja foram inoculadas com cada isolado de *S.sclerotiorum*, e submetidas a testes de incubação em substrato, contendo meio NEON, composto de 150 mg de sulfato de estreptomicina, 150 mg de penicilina G e 150 mg de azul de bromofenol, que foram acrescentados ao meio BDA (Nasser, Boland e Sutton, 1995) à temperatura de 50°C . O pH do meio foi ajustado para 4,7 com ácido clorídrico e hidróxido de sódio 1N. As sementes inoculadas com cada isolado de *S.sclerotiorum* foram plaqueadas em placas de plástico de 6 cm de diâmetro, contendo

15 ml de meio NEON. Metade das sementes inoculadas foi desinfestada com hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos, lavada por duas vezes em água destilada esterilizada e seca sob papel absorvente em câmara de fluxo laminar por 10 minutos, previamente ao plaqueamento no meio NEON. As placas contendo as sementes foram incubadas em câmaras com temperaturas de $14\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, por 7 dias, no escuro. Após esse período de incubação, as sementes, ao redor das quais houve mudança de coloração, foram analisadas sob microscópio estereoscópico, quanto ao crescimento de micélio característico e presença de escleródios de *S.sclerotiorum*.

Quatro modificações da técnica empregando o princípio de mudança de coloração do meio NEON foram testadas. A primeira constou de plaqueamento de sementes inoculadas sobre dois discos de papel de filtro impregnados com o meio NEON. A segunda modificação constou de plaqueamento de sementes sobre três discos de papel de filtro embebidos em ágar/água 0,5% acrescido de 500 mg de azul de bromofenol. Na terceira modificação as sementes foram plaqueadas sobre dois discos de papel de filtro embebidos em ágar/água 0,5% acrescido de 500 mg de azul de bromofenol. Sobre as sementes plaqueadas foi colocado outro disco de papel de filtro, também embebido em ágar/água acrescido do indicador, nas mesmas condições citadas. A quarta modificação constou de sementes plaqueadas em ágar/água 2% acrescido de 50 mg de azul de bromofenol (15 ml de meio/placa de 6 cm de diâmetro).

Para todas as modificações cada isolado foi analisado individualmente, sendo cada parcela experimental constituída por uma placa de plástico de 6 cm de diâmetro contendo 10 sementes. Utilizou-se o esquema fatorial de 2 tratamentos de desinfestação superficial x 2 temperaturas de incubação. Foram feitas quatro

repetições e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, após transformação por $\log(x + 10)$.

5.2.2 Comportamento da microflora associada a sementes de feijão e soja no meio NEON

5.2.2.1 Obtenção dos isolados

A partir do "Blotter test" realizado nos trabalhos do Capítulo I, em câmara asséptica, com o auxílio de microscópio estereoscópico, fez-se o isolamento direto de fungos e bactérias presentes nas sementes de feijão e soja.

Os fungos foram transferidos para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio BDA (200g de batata, 20 g de ágar purificado-Merck e 20 g de dextrose/l), e incubados em câmaras de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ sob regime de alternância de 12 horas luz/escuro. Após o crescimento dos isolados, discos de 5 mm de micélio, retirados das margens das colônias, foram transferidos para novas placas de Petri contendo meio BDA, e incubados nas mesmas condições anteriormente descritas, por um período de 5 a 7 dias, obtendo-se desta forma as culturas puras.

As bactérias foram transferidas para meio BDA, incubadas por 24 horas em câmara com temperatura de 30°C e repicadas para meio 523 (Kado e Heskett, 1970). Os isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* testados foram obtidos conforme metodologia descrita no Capítulo I. Foram testados também isolados de fungos obtidos junto à micoteca do Laboratório de Patologia de Sementes da UFLA e isolados de bactérias obtidos junto ao Laboratório de Fitopatologia da UFLA.

5.2.2.2 Avaliação do comportamento de fungos no meio NEON

Os isolados fúngicos foram incubados por 7 dias em câmara de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ sob regime de alternância de 12 horas luz/escuro. Em câmara asséptica fez-se a transferência de um disco de 5 mm de diâmetro do meio contendo micélio, retirados das margens das colônias, para o centro de placas de plástico de 6 cm de diâmetro, esterilizadas com formol 10% por 48 horas, contendo 15 ml de meio NEON e incubadas por 48 horas em câmaras de $14\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, sob escuro total. Após esse período de incubação as placas foram avaliadas quanto à mudança de coloração do meio NEON ao redor do disco de micélio fúngico. Foram feitas quatro repetições para cada isolado testado.

5.2.2.3 Avaliação do comportamento de bactérias no meio NEON

As bactérias obtidas foram crescidas por 24 horas em meio 523 (Kado e Heskett, 1970), sob temperatura de 30°C . Em câmara asséptica, as mesmas foram riscadas no meio NEON sem antibióticos (150 mg de azul de bromofenol/ 1 litro de BDA, pH 4,7). As placas foram incubadas por 48 horas nas condições acima citadas e após esse período avaliadas quanto à mudança de coloração ao redor das colônias em crescimento. Foram feitas quatro repetições para cada isolado de bactéria testado.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio NEON e suas modificações

Os resultados deste estudo se encontram nas Tabelas 3, 4, 5, 6 e 7.

TABELA 3. Percentagem de *S.sclerotiorum* em sementes de feijão e soja, inoculadas com os diferentes isolados e determinadas pelo meio NEON, sob duas temperaturas de incubação. UFLA, Lavras - MG, 1996.

ISOLADOS	TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO / TRATAMENTO				C.V.(%)
	14°C		20°C		
	ND	D	ND	D	
FEIJÃO					
C-19	34,448 a A	8,626 b B	37,974 a A	33,692 a A	4,103
H	32,803 a A	1,952 b B	19,664 a B	21,448 a A	4,158
O	40,000 a A	11,612 a A	23,937 a A	23,180 a A	5,888
L	40,000 ns	37,974 ns	33,692 ns	40,000 ns	1,859
Testemunha	0,000	0,000	0,000	0,000	
SOJA					
C-19	34,927 ns	38,980 ns	37,974 ns	36,927 ns	1,375
H	32,803 a A	0,000 b B	38,980 a A	10,536 b A	6,611
O	40,000 ns	18,573 ns	28,578 ns	32,563 ns	1,609
L	40,000 ns	38,980 ns	34,927 ns	35,836 ns	1,375
Testemunha	0,000	0,000	0,000	0,000	

Médias seguidas por mesma letra minúscula (Tratamentos) e maiúscula (Temperaturas de incubação) não diferem entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.

ND- não desinfestadas

D- desinfestadas com hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos

TABELA 4. Percentagem de *S.sclerotiorum* em sementes de feijão e soja, inoculadas com diferentes isolados e determinadas pelo método de incubação em Papel de Filtro impregnado com meio NEON, sob duas temperaturas. UFLA, Lavras - MG, 1996.

ISOLADOS	TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO / TRATAMENTO				C.V.(%)
	14°C		20°C		
	ND	D	ND	D	
FEIJÃO					
C-19	16,932 ns	3,910 ns	21,724 ns	7,268 ns	6,344
H	33,864 ns	31,721 ns	33,915 ns	34,927 ns	2,483
O	33,864 a A	8,626 b B	21,494 a A	21,655 a A	4,556
L	40,000 a A	25,904 b B	40,000 a A	37,920 a A	1,391
Testemunha	0,000	0,000	0,000	0,000	
SOJA					
C-19	40,000 a A	10,000 b B	34,869 a A	28,791 a A	2,922
H	24,857 ns	11,444 ns	28,972 ns	20,110 ns	8,406
O	40,000 ns	1,952 ns	40,000 ns	14,155 ns	5,469
L	40,000 ns	34,869 ns	34,817 ns	18,083 ns	5,517
Testemunha	0,000	0,000	0,000	0,000	

Médias seguidas por mesma letra minúscula (Tratamentos) e maiúscula (Temperaturas de incubação) não diferem entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.

ND- não desinfestadas

D- desinfestadas com hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos

TABELA 5. Percentagem de *S.sclerotiorum* em sementes de feijão e soja, inoculadas com os diferentes isolados e determinadas pelo método de incubação em Papel de Filtro impregnado com meio ágar/água acrescido de azul de bromofenol, sob duas temperaturas. UFLA, Lavras - MG, 1996.

ISOLADOS	TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO / TRATAMENTO				C.V.(%)
	14°C		20°C		
	ND	D	ND	D	
FEIJÃO					
C-19	2,874 ns	0,000 ns	0,000 ns	0,000 ns	1,889
H	15,876 ns	7,762 ns	26,656 ns	18,605 ns	7,329
O	13,253 ns	0,964 ns	20,908 ns	0,964 ns	4,263
L	27,940 ns	13,814 ns	35,659 ns	32,646 ns	3,413
Testemunha	0,000	0,000	0,000	0,000	
SOJA					
C-19	19,554 ns	7,916 ns	24,857 ns	7,662 ns	4,228
H	24,977 ns	27,704 ns	36,000 ns	25,238 ns	3,680
O	19,390 ns	8,592 ns	27,940 ns	8,884 ns	4,263
L	27,815 a A	11,922 b A	34,927 a A	7,733 b A	3,165
Testemunha	0,000	0,000	0,000	0,000	

Médias seguidas por mesma letra minúscula (Tratamentos) e maiúscula (Temperaturas de incubação) não diferem entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.

ND- não desinfestadas

D- desinfestadas com hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos

TABELA 6. Percentagem de *S.sclerotiorum* em sementes de feijão e soja, inoculadas com os diferentes isolados e determinadas pelo método de incubação em Papel de Filtro impregnado com meio ágar/água acrescido de azul de bromofenol, sob duas temperaturas (sementes cobertas com papel de filtro). UFLA, Lavras - MG, 1996.

ISOLADOS	TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO / TRATAMENTO				C.V.(%)
	14°C		20°C		
	ND	D	ND	D	
FEIJÃO					
C-19	24,722 ns	9,661 ns	35,836 ns	7,448 ns	6,311
H	30,758 ns	14,538 ns	38,980 ns	30,408 ns	4,120
O	9,575 ns	0,964 ns	24,552 ns	3,741 ns	4,820
L	40,000 ns	28,806 ns	40,000 ns	30,978 ns	1,555
Testemunha	0,000	0,000	0,000	0,000	
SOJA					
C-19	33,499 ns	20,523 ns	20,848 ns	22,728 ns	4,325
H	36,927 a A	15,928 b B	38,980 a A	34,695 a A	2,320
O	37,974 a A	8,000 b B	40,000 a A	17,667 b A	2,329
L	35,836 ns	9,638 ns	31,272 ns	7,916 ns	4,459
Testemunha	0,000	0,000	0,000	0,000	

Médias seguidas por mesma letra minúscula (Tratamentos) e maiúscula (Temperaturas de incubação) não diferem entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.

ND- não desinfestadas

D- desinfestadas com hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos

TABELA 7. Percentagem de *S.sclerotiorum* em sementes de feijão e soja, inoculadas com os diferentes isolados e determinadas pelo meio ágar/água acrescido de azul de bromofenol, sob duas temperaturas. UFLA, Lavras - MG, 1996.

ISOLADOS	TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO / TRATAMENTO				C.V.(%)
	14°C		20°C		
	ND	D	ND	D	
FEIJÃO					
C-19	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
H	26,225 a A	1,952 b A	5,781 a B	8,884 a A	4,602
O	2,963 a B	0,964 a A	28,738 a A	3,510 b A	4,182
L	23,581 a A	7,547 b A	9,609 a B	17,826 a A	5,108
Testemunha	0,000	0,000	0,000	0,000	
SOJA					
C-19	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
H	17,852 ns	1,952 ns	13,640 ns	6,885 ns	5,661
O	26,546 ns	11,612 ns	28,738 ns	3,510 ns	5,235
L	31,838 a A	19,631 a A	11,416 b B	30,758 a A	4,524
Testemunha	0,000	0,000	0,000	0,000	

Médias seguidas por mesma letra minúscula (Tratamentos) e maiúscula (Temperaturas de incubação) não diferem entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.

ND- não desinfestadas

D- desinfestadas com hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos

Em relação ao meio NEON viu-se que o desenvolvimento dos isolados associados às sementes de feijão e soja foi rápido, havendo mudança nítida de coloração em volta das mesmas (Figura 1). Isto pode ser atribuído à riqueza do meio BDA, que é uma fonte rica em carboidratos, o que favorece o crescimento dos fungos. Para algumas sementes a incubação por 24 horas já apresentava a mudança de coloração do meio de púrpura para amarelo claro ao seu redor, evidenciando a produção de ácidos pelo patógeno presente nas mesmas.

O azul de bromofenol é um indicador ácido-básico que atua num intervalo de pH de 2,8 à 4,6 (Voguel, 1960). A mudança de coloração ocorrida no meio NEON, de púrpura para amarelada ao redor das sementes certamente foi devido à interação do indicador com os íons H^+ liberados no meio pela produção de ácido oxálico, induzindo um processo de isomeria. Desta forma o H^+ ligado ao indicador formou um isômero de coloração amarelada, indicando a presença do patógeno nas sementes. Alguns trabalhos mostram que *S.sclerotiorum* cresce e produz escleródios em meio com um pH inicial que varia de 2,5 à 9, sendo que o pH do meio pode ser mudado durante o crescimento e produção de ácidos orgânicos pelo patógeno (Le Tourneau, 1979). Acredita-se que à pH 4,7 o meio NEON se torne ainda mais sensível uma vez que o azul de bromofenol indica a presença do patógeno à baixas produções do ácido.

Houve variação nos níveis de inóculo das sementes artificialmente infectadas, conforme indicado pelas análises estatísticas, porém a mudança de coloração indicada no meio NEON foi semelhante entre os isolados.

Se comparado ao "Blotter test" com 30 dias de incubação para detecção de *S.sclerotiorum* em sementes de feijão e soja, recomendado por Brasil (1992), pode-se afirmar que o meio NEON é rápido para detecção desse patógeno em sementes, pois a mudança de coloração no mesmo já era evidenciada em média com 48 horas. A semi-seletividade deste meio pôde ser confirmada pela observação da mudança de coloração próxima às sementes promovida por outros fungos. A possibilidade de dúvidas sobre a identidade de *S.sclerotiorum* pode ser descartada pela observação dos aspectos morfológicos das colônias no meio de cultura pois, os demais fungos promovedores de mudança de coloração no meio NEON apresentam características morfológicas que os distinguem de *S.sclerotiorum*, facilmente.

Além de ser considerado um método rápido, o meio NEON apresenta a vantagem de se utilizar o microscópio estereoscópico apenas em casos de alterações da coloração envolta das sementes para confirmação da presença do patógeno em questão, contribuindo para a rapidez e praticidade da análise sanitária.

A detecção de *S.sclerotiorum*, pelo "Blotter test", é baseado apenas na presença ou ausência de escleródios próximos às mesmas. Segundo Menezes e Oliveira (1993) a fase conidial de *S.sclerotiorum* é desconhecida. Le Tourneau (1979), afirma que alguns isolados desse fungo podem perder a habilidade de produção de escleródios após várias repicagens. Este fato pode ser devido à inabilidade de sintetizarem compostos requeridos para a formação de escleródios. A deficiência de produção dessas estruturas de perpetuação por alguns isolados pode ser também devido à presença de algumas substâncias inibitórias no meio. Diante dessas afirmações pode-se assumir que a eficiência dos métodos de detecção de *S.sclerotiorum* em sementes é questionável, uma vez que o tempo de incubação das

sementes por 30 dias é considerado excessivamente longo o que inviabiliza a análise sanitária de rotina. Além disso, o fato de alguns isolados serem incapazes de produzir escleródios facilmente, dificultam a identificação do fungo pelo "Blotter test".

O meio NEON surge como uma alternativa de detecção desse importante fitopatógeno em sementes devido ao rápido período de incubação das mesmas, apresentando porém o inconveniente de ser semi-seletivo, pela mudança de coloração por outros gêneros de organismos que podem acompanhar as sementes, comprometendo por conseguinte a identificação conclusiva de *S.sclerotiorum*. Como uma forma de se assegurar a precisão deste método observações aos 7 dias de incubação foram suficientes para a diferenciação entre *S.sclerotiorum* e outros organismos que podem também mudar a coloração do meio. A formação de escleródios no meio NEON foi outra evidência da presença do fungo, assim como o padrão característico de crescimento micelial ao redor das sementes, onde ocorreu a mudança de coloração por *S.sclerotiorum*.

Apesar de variações entre os níveis de inóculo, o meio NEON pode ser considerado eficiente nas duas temperaturas testadas, para as sementes inoculadas com a maioria dos isolados. Houve uma tendência de maior incidência de *S. sclerotiorum* na câmara de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, para alguns isolados; sendo a câmara de $14\pm 2^{\circ}\text{C}$ menos eficiente para a detecção do patógeno, quando interno nas sementes. Esses dados corroboram com trabalhos de Abawi e Grogan (1975), quando foram estudados os efeitos da temperatura e umidade na infecção por *S.sclerotiorum* sendo o maior crescimento micelial, indicado pela medição do diâmetro da colônia, a uma temperatura de 20 a 25°C .

Uma das dificuldades encontradas na incubação à temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ foi o crescimento mais rápido e vigoroso da maioria dos outros fungos, associados às sementes, o que dificultou a identificação mais rápida e precisa de *S.sclerotiorum*, uma vez que essa parece ser ainda uma temperatura favorável para o desenvolvimento rápido da maioria dos fitopatógenos. Deve-se considerar porém que os laboratórios de análise de sanidade são equipados com câmaras com temperaturas de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ o que faz com que alterações de temperaturas nestas circunstâncias não seja uma recomendação de natureza prática.

Os resultados das modificações do meio NEON indicam que é possível a utilização de substratos alternativos com este princípio de mudança de coloração, que futuramente possam vir a contribuir com a diminuição dos custos da análise de rotina. Isto foi confirmado em estudos onde se utilizou papel embebido nesse meio de cultura, com resultados satisfatórios. Em substratos contendo apenas ágar e indicador, apesar de alguns isolados ter conseguido promover mudança de coloração do meio ao redor das sementes, houve um decréscimo na incidência de *S.sclerotiorum*. No caso da modificação do meio NEON, onde as sementes foram plaqueadas em meio ágar contendo indicador, houve um maior crescimento do fungo em cima das mesmas, com produção de escleródios, sendo este o único fato que permitiu indicar a presença de *S.sclerotiorum*, pois não houve mudança característica na coloração do meio. Segundo trabalhos de Silva (1989), onde foram testadas algumas metodologias de inoculação de *S.sclerotiorum* em plantas de soja, o micélio produzido em substrato pobre como ágar-água, não foi capaz de iniciar o processo infeccioso em tecidos suscetíveis. Segundo esse autor tal fato, seguramente ocorreu, devido à falta de elementos nutritivos do meio no qual o fungo cresceu, em concordância com trabalhos de Sutton e Deverall (1983).

A falta de uma fonte de energia no substrato à base de ágar-água pode ter contribuído para cobertura das sementes pelo micélio do fungo, sugerindo que em substratos pobres o pouco crescimento do patógeno e a não produção de ácido oxálico parecem ser insuficientes para promover a mudança de coloração do meio.

O isolado C-19 não conseguiu crescer no substrato ágar acrescido de indicador, em nenhuma das temperaturas, tanto nas sementes de feijão ou soja. Trabalhos de Purdy e Grogan (1954) mostram que o crescimento de *S.sclerotiorum* e a formação de escleródios ocorreram apenas quando alguns micronutrientes orgânicos como P, K, Mg, e S estavam presentes ao meio. Vega e Le Tourneau (1974) afirmam que quando *S.sclerotiorum* foi cultivado em meio líquido contendo nutrientes químicos, menores quantidades de micélio fresco foram produzidas, e três dos quatro isolados testados não produziram escleródios na ausência de Zn. Esses dados evidenciam a essencialidade, para alguns isolados, de uma fonte de energia para o crescimento em seus hospedeiros ou em meio de cultura.

5.3.2 Comportamento da microflora associada a sementes de feijão e soja no meio NEON

Observa-se pelos resultados das Tabelas 8, 9 e 10 que houve mudança na coloração do meio NEON promovida por alguns organismos testados.

A mudança de coloração do indicador (azul de bromofenol) presente no meio NEON mostra uma alteração no pH do meio, indicando uma produção de substâncias ácidas pelos patógenos, conforme indicado na Figura 2 para o caso de *S.sclerotiorum*.



FIGURA 1. Sementes de feijão (placa superior) mostrando coloração amarela produzida por *Sclerotinia sclerotiorum*.

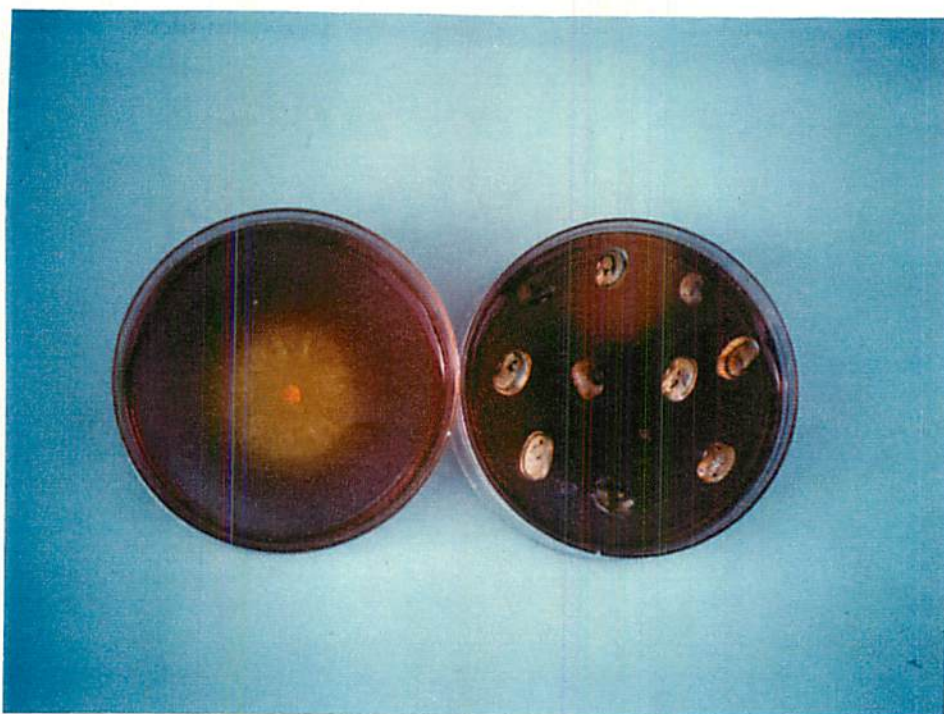


FIGURA 2. Cultura pura de *Sclerotinia sclerotiorum* (esquerda) e sementes de feijão (direita) mostrando mudança na coloração do meio NEON.

TABELA 8. Comportamento dos fungos no meio NEON à 14°C. UFLA, Lavras - MG, 1996.

Organismos	Fonte	Nº total de isolados testados	Nº isolados que promoveu mudança de coloração no meio
<i>Aspergillus</i> sp	soja	9	1
	feijão	5	1
<i>Penicillium</i> sp	soja	7	6
	feijão	3	2
<i>Rhizopus stolonifer</i>	soja	1	1
	feijão	1	1
<i>Fusarium</i> sp	soja	2	1
	feijão	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	soja	1	-
	feijão	-	-
<i>Sclerotium rolfsii</i>	LPS-UFLA	1	1
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	LPS-UFLA	1	-
<i>Chaetomium globosum</i>	LPS-UFLA	1	-
<i>Macrophomina phaseolina</i>	LPS-UFLA	1	-
<i>Phomopsis</i> sp	LPS-UFLA	1	-
<i>Alternaria alternata</i>	LPS-UFLA	2	-
<i>Colletotrichum truncatum</i>	LPS-UFLA	1	-
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	LPS-UFLA	1	-
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	feijão	4	4

LPS- Laboratório de Patologia de Sementes da UFLA

- = Não promoveu mudança de coloração do meio NEON

TABELA 9. Comportamento dos fungos no meio NEON à 20°C. UFLA, Lavras - MG, 1996.

Organismos	Fonte	Nº total de isolados testados	Nº isolados que promoveu mudança de coloração no meio
<i>Aspergillus</i> sp	soja	9	1
	feijão	5	1
<i>Penicillium</i> sp	soja	7	7
	feijão	3	2
<i>Rhizopus stolonifer</i>	soja	1	1
	feijão	1	1
<i>Fusarium</i>	soja	2	-
	feijão	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	soja	1	-
	feijão	-	-
<i>Sclerotium rolfsii</i>	LPS-UFLA	1	1
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	LPS-UFLA	1	-
<i>Chaetomium globosum</i>	LPS-UFLA	1	-
<i>Macrophomina phaseolina</i>	LPS-UFLA	1	-
<i>Phomopsis</i> sp	LPS-UFLA	1	-
<i>Alemaria alternata</i>	LPS-UFLA	2	-
<i>Colletotrichum truncatum</i>	LPS-UFLA	1	-
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	LPS-UFLA	1	-
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	feijão	4	4

LPS- Laboratório de Patologia de Sementes da UFLA

- = Não promoveu mudança de coloração do meio NEON

TABELA 10. Comportamento de bactérias no meio NEON à 30°C. UFLA, Lavras - MG, 1996.

Organismos	Fonte	Nº total de isolados testados	Nº isolados que promoveu mudança de coloração no meio
<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>phaseoli</i>	DFS-UFLA	1	-
<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	DFS-UFLA	1	-
Bactéria (I.D.)	SOJA	4	1
Bactéria (I.D.)	FEIJÃO	1	1

DFS-UFLA- Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal de Lavras
(I.D.)-Identidade Desconhecida

- = Não promoveu mudança de coloração do meio NEON

A produção de ácidos por fungos fitopatogênicos é conhecida e relatada por diversos pesquisadores em diferentes circunstâncias. Podem ser citados como exemplo a produção de ácido oxálico por *Penicillium oxalicum*, *P.frequentans*, *Aspergillus flavus*, *A.fumigatus*, *A.niger* e *Sclerotinia sclerotiorum*; ácido kójico por *Penicillium daleae*, *P.purpurogenum*, *Aspergillus oryzae*, *A.flavus*, *A.fumigatus*, *A.clavatus* e *A.candidus*; ácido fúlvico por *A.flavus*; ácido cítrico por *A.fumigatus*, *Penicillium chrysogenum* e *P.frequentans*; ácido glicólico por *A.niger* e *S.sclerotiorum*; ácido acético por *A.niger*; ácido glucônico por *P.chrysogenum*, *P.citrinum* e *P.expansum* e ácido fusárico por *Fusarium oxysporum* (Domsch, Gams e Anderson, 1980). Agrios (1988) reporta a produção de ácido fumárico por *Rhizopus* spp; ácido oxálico por *Sclerotium* spp e *Endothia parasitica*; ácido alternárico por *Alternaria* sp; Esse mesmo autor sugere ainda que reguladores de crescimento como ácido indolacético, ácido giberélico, cinetina e zeatina bem como outros compostos como o etileno, e inibidores de crescimento como ácido abscísico, são secretados por alguns fungos e bactérias.

Kurian e Stelzig (1979) estudando o crescimento e produção de ácido oxálico por *Cristulariella pyramidalis* em meio de cultura seletivo verificaram que a acumulação máxima do ácido correspondeu ao pH mínimo do meio que variou de 4,2 à 3,3. Pluim, Tewari e Knowles (1994) em estudos sobre variação de raças e produção de ácido oxálico por *Cytospora leucostoma* afirmam que a produção do ácido variou com o isolado e a idade da cultura, sendo que o pH do meio diminuiu à medida que o fungo cresceu e o ácido teve os primeiros níveis detectados a um pH que variou de 2,6 a 4,0.

Pelas observações deste estudo pôde-se notar um comportamento semelhante entre os isolados de *Rhizopus* sp, *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum* no meio NEON, uma vez que esses fungos promoveram uma mudança de coloração de púrpura para um amarelo bem mais claro que os demais, evidenciando a produção de substâncias comuns entre esses organismos que podem causar um abaixamento no pH do meio NEON.

Estudos com *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, *P. solanacearum*, *P. amygdali*, *Rhizobium trifolii*, *R. meliloti* e *Rhodococcus fasciens* têm demonstrado a produção de ácido indolacético e/ou citocininas *in vitro* por algumas espécies fitopatogênicas (Klement, Rudolph e Sands, 1990). Segundo esses autores, a produção de ácidos e pigmentos é normalmente dependente da temperatura, aeração e/ou ingredientes do meio de cultura. A produção, por exemplo de xanthomonadinas, pigmento amarelo, por *Xanthomonas campestris* é característica de bactéria desse gênero e que apresenta coloração amarela. Segundo Ferreira e Salgado (1995) algumas bactérias produzem ácidos à partir de carboidratos do meio, indicado pela mudança de coloração do meio de verde para amarelo, sendo este teste

bioquímico utilizado para identificação desses organismos. A mudança de coloração do meio NEON ao redor das colônias em crescimento de dois isolados de bactérias não identificadas confirmam a produção de ácidos por bactérias.

A mudança de coloração por todos os isolados de *S.sclerotiorum* foi iniciada após 24 horas de repicagem do fungo, aumentando proporcionalmente ao seu desenvolvimento. Os isolados de *Penicillium* e *Aspergillus* promoveram mudança na coloração do meio, porém, a mudança não acompanhou o desenvolvimento da colônia, sendo ainda a cor menos intensa que a promovida por *S.sclerotiorum*.

5.4 CONCLUSÕES

O meio NEON é uma alternativa viável para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão e soja com incubação sob temperaturas na faixa de 14 à 20±2°C, no escuro, em um período de 7 dias.

Alguns microrganismos associados às sementes de feijão e soja podem ter comportamento semelhante à *S.sclerotiorum*, promovendo mudança de coloração do meio NEON, confirmando a semi-seletividade do mesmo. Porém este fato não inviabiliza a eficiência dessa metodologia para detectar *S.sclerotiorum* uma vez que as características morfológicas das colônias de fungos e bactérias, normalmente transmitidos por sementes de feijão e soja e que causam alterações na coloração do meio NEON, são diferentes das características de *S.sclerotiorum* e facilmente distinguidas em exame de rotina.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAWI, G. S.; GROGAN, R. G. Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, St. Paul, v.65, n.3, p.300-309, Mar., 1975.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. San Diego: Academic Press, 1988. 803p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, 1992. 365p.
- DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, TRAUTE-HEIDI. **Compendium of Soil Fungi**. London: Academic Press, 1980. v.1, 859p.
- FERREIRA, L. P. e SALGADO, C. L. Bactérias. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.97-130.
- GERMEIER, C., HEDKE, K., TIEDEMANN, A. V. The use of pH indicators in diagnostic media for acid-producing plant pathogens. **Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, Giessen, v.101, n.5, p. 498-507, 1994.
- ISTA-INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Handbook on seed health testing**. Zurich, 1981. n. p. (Working sheets. Section 2).
- KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopatologia**, St. Paul, v.60, n.6, p.969-976, june, 1970.
- KLEMENT, Z.; RUDOLPH, K e SANDS, D. C. **Methods in Phyto bacteriology**. Budapest: Akademiai Kiado, 1990. 568p.
- KURIAN, P. e STELZIG, D. A. The synergistic role of oxalic acid and endopolygalacturonase in beanleaves infected by *Cristulariella pyramidalis*. **Phytopathology**, St. Paul, v.69, n.12, p.1301-1304, Aug., 1979.
- LE TOURNEAU, D. Morphology, cytology, and physiology of *Sclerotinia* species in culture. **Phytopathology**, St. Paul, v.69, n.8, p.887-890, Aug., 1979.
- MENEZES, M.; OLIVEIRA, S. M. A. **Fungos Fitopatogênicos**. Recife: UFRPE, 1993. 277p.

- NASSER, L. C. B.; BOLAND, G. J.; SUTTON, J. C. Meio de cultura semi-seletivo para detecção da viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 28, Ilhéus, 1995. Resumos... Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1995. p.376.
- PLUIM, R. A.; TEWARI, J. P.; KNOWLES, N. R. Strain variation and oxalic acid production by *Cytospora leucostoma* isolated from saskatoon (*Amelanchier alnifolia*). *Plant Disease*, Minnesota, v.78, n.6, p.551-557, June, 1994.
- PURDY, L. H. e GROGAN, R. C. Physiological studies of *Sclerotinia sclerotiorum* in liquid and agar culture. *Phytopathology*, St. Paul, v.44, p.36-38, 1954.
- SILVA, S. M. Metodologia de inoculação e comportamento de alguns cultivares de soja em relação a *Sclerotinia sclerotiorum*. Lavras: UFLA, 1989. 59p. (Tese - Mestrado em Fitossanidade).
- STEADMAN, J. R.; MARCINKOWSKA, J.; RUTLEDGE, S. A semi-selective medium for isolation of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Guelph, v.16, n.1, p.68-70, 1994.
- SUTTON, D. C. e DEVERALL, B. J. Studies on infection of bean (*Phaseolus vulgaris*) and soybean (*Glycine max*) by ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology*, New York, v.32, n.3, p.251-261, Sept., 1983.
- VEGA, R. R. e LE TOURNEAU, D. The effect of zinc on growth and sclerotia formation in *Whetzelinia sclerotiorum*. *Mycologia*, New York, v.66, p.256-264. 1974.
- VOGEL, A. I. *Química Analítica Quantitativa*. Buenos Aires: Editorial Kapelusz, 1960, v.1. 812p.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A detecção de *Sclerotinia sclerotiorum*, pelos testes de sanidade, é uma das maneiras de se evitar a comercialização de sementes portadoras de inóculo, que constituem em risco de introdução desse patógeno em áreas isentas. Considerando-se que o nível de tolerância de *S.sclerotiorum* em sementes de feijão e soja proposto para sementes básicas e certificadas no Brasil é zero, e tendo-se em vista a dificuldade metodológica na análise deste patógeno pelo tempo demandado para realização dos testes, nota-se que a detecção segura do mesmo é questionável.

Uma das dificuldades para estudos das relações desse fungo com sementes é a obtenção de amostras com altos níveis do patógeno. Neste trabalho, a metodologia de inoculação de sementes testada, de fácil execução, permitiu a obtenção de sementes com níveis satisfatórios desse patógeno, para que estudos de novas metodologias para detecção do mesmo fossem realizados.

Patógenos de natureza quarentenária como *S.sclerotiorum*, cuja fase perfeita constitui também uma importante fonte para inóculo disseminado pelo ar, requerem métodos rápidos e precisos de detecção. O meio NEON demonstrou ser uma metodologia com características importantes a um método de detecção, requerendo no entanto checagem de sua eficiência prática, utilizando amostras de sementes com níveis naturais do patógeno.

Apesar de ser um meio semi-seletivo, pois foi comprovado que outros organismos associados às sementes podem também mudar a coloração do meio NEON, o comprometimento dessa metodologia em relação à esse fator pode ser descartado, uma vez que as diferenças morfológicas entre esses organismos são facilmente identificadas em análise de rotina.

Os resultados desse estudo demonstraram que o meio NEON torna-se adequado para ser utilizado em Laboratórios de Análises Sanitárias de Rotina e Programas de Certificação de Sementes, objetivando a detecção rápida e segura de *S.sclerotiorum*, com vantagem de ser também um método objetivo, eliminando a subjetividade do analista quando da realização dos testes.