Revista Agrarian
ISSN: 1984-2538

Comunicação Científica

Interferência do substrato vegetal na produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary

Interference of the substrate in the production of sclerotia of Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) De Bary

Luciana Zago Ethur[1], Andrio Spiller Copatti[2], Tuane Araldi da Silva[2], Luana da Silva Cadore[1], Jean Carlos Frezingheli de Fresinghelli[1]

[1]Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus Itaqui. Rua Luiz Joaquim de Sá Britto, s.n. Bairro Promorar. Itaqui – RS, 97650-000. E-mail: lucianaethur@unipampa.edu.br
[2]Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM)/Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Recebido em: 30/03/2014 Aceito em:08/10/2016

Resumo. O fitopatógeno *Sclerotinia sclerotioum* é um fungo de solo que causa doença em várias culturas e produz escleródios que podem permanecer no solo por longo período de tempo. O objetivo do trabalho foi avaliar a interferência do substrato vegetal na produção de escleródios de *S. sclerotiorum* para serem utilizados em trabalhos de pesquisa com esse patógeno. Para isso, raízes tuberosas de beterraba, cenoura, batata doce e mandioca, além do tubérculo de batata inglesa, foram colocadas em fatias dentro de beckers, autoclavadas e inoculadas com micélio do fungo. Após 30 dias foi realizada a avaliação que constou do número, massa, comprimento e largura dos escleródios produzidos. De acordo com os resultados encontrados, observou-se que o substrato que apresentou maior número de escleródios foi à base de batata inglesa, porém ocorreu um padrão de comprimento, largura, área e massa, no desenvolvimento dos escleródios, que não levou em consideração os substratos vegetais testados. Portanto, os cinco substratos vegetais podem ser utilizados na produção de escleródios de *S. sclerotiorum*.

Palavras-chave. Estrutura de resistência, fungo fitopatogênico, mofo branco, produção de inóculo

Abstract. The pathogen *Sclerotinia sclerotioum* is a soil fungus that causes disease in many cultures and produces sclerotia which may remain in the soil for much time. The objective of this research was to evaluate the effect of substrate in the production of sclerotia of *S. sclerotiorum* for use in researches with this pathogen. Slices of the beets, carrots, sweet potatoes, cassava and potato, were placed in beckers, autoclaved and inoculated with mycelium of the fungus. After 30 days the assessment consisted of the number, weight, length and width of sclerotia produced. According to the results, it was observed that the substrate with potato had a greater number of sclerotia, but there was a pattern of length, width, area and weight in the development of sclerotia, which did not take into account the substrates. Therefore, the five substrates can be used in the production of sclerotia of *S. sclerotiorum*.

Keywords. Resistance structure, plant pathogenic fungus, white mold, inoculum production

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (lib.) de Bary é um fitopatógeno habitante do solo que apresenta ampla gama de hospedeiros e causa a doença denominada mofo branco. O fitopatógeno tem como característica a formação de estruturas de resistência denominadas escleródios.

Os escleródios, segundo Le Tourneau (1979), são estruturas formadas principalmente de um tegumento de melanina e um componente interno composto de carboidratos (principalmente beta-1,3-glucanos) e proteínas. Essas estruturas de resistência formadas por hifas compactadas, são formadas dentro e na superfície dos tecidos vegetais colonizados e retornam ao solo com os resíduos da cultura (Garcia et al., 2012) e são a forma na qual o patógeno se perpetua no ambiente solo e faz do *S. sclerotiorum* um dos fitopatógenos de difícil controle. Dos escleródios podem germinar hifas, que infectam o colo da planta, ou formar apotécios, que são corpos de frutificação do

Revista Agrarian
ISSN: 1984-2538

fungo, por onde são formados e liberados esporos, que infectam a parte aérea da planta hospedeira.

A viabilidade dos escleródios de *S. sclerotiorum* que permanecem nas áreas de cultivo de várias culturas comerciais ou olerícolas está entre 3 e 8 anos e depende de fatores do solo, tais como temperatura, umidade e pH (Adams & Ayers, 1981). Segundo Adams & Ayers (1981), a composição biológica do solo é o fator determinante de sua sobrevivência, ocorrendo ampla variedade de fungos com atividades antagonísticas aos escleródios de *S. sclerotiorum* (Zazzerini & Tosi, 1985; Illipronti Jr. & Machado, 1993; Ethur et al., 2005; Ferraz et al., 2011; Ethur et al., 2014). Portanto, os escleródios são o foco das pesquisas relacionadas ao controle do *S. sclerotiorum*, uma vez que são vitais para a permanência do inóculo do fitopatógeno no solo, entre e durante os cultivos.

A produção de escleródios para experimentos com *S. sclerotioum* foi citada para alguns meios de cultura, tais como, meio BDA (Ethur et al., 2005), meio Czapek enriquecido com sucrose (Budge & Whipps, 2001), meio fubá/areia/água (Illipronti Jr. & Machado, 1993), grãos de trigo (Budge & Whipps, 2001; Liu & Paul, 2007), grãos de cevada (Matheron & Porchas, 2005), meio de cenoura/fubá (Ferraz et al., 2011) e cenoura (Garcia et al., 2012). Certamente muitos substratos vegetais podem ser testados, pois o desenvolvimento dessas estruturas de resistência é influenciado pelo aporte nutricional disponibilizado pelo substrato.

Existe necessidade de se produzir escleródios em grande quantidade para experimentos em laboratório, casa de vegetação e a campo, além dos experimentos que necessitam de uniformidade quanto ao tamanho, massa e forma dessas estruturas de resistência (Liu & Paul, 2007; Ferraz et al., 2011; Ethur et al., 2014; Venturoso et al., 2014). Conforme Serra & Silva (2005), a busca por meios de cultura de baixo custo e eficientes para induzir a produção de escleródios de *Sclerotium rolfsii* Sacc.; é de grande importância para estudos do patógeno. De acordo com o exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a interferência do substrato vegetal na produção de escleródios de *S. sclerotiorum* para serem utilizados em trabalhos de pesquisa com esse patógeno.

O isolado de *S. sclerotiorum* utilizado foi disponibilizado pelo Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia do Solo do Campus Itaqui/UNIPAMPA. Escleródios de *S. sclerotiorum* foram colocados em placas de petri, contendo meio de cultura BDA (batata, dextrose, agar), com adição de cloranfenicol na proporção de 1mL L^{-1}, para o desenvolvimento do fitopatógeno.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram de acordo com os diferentes substratos vegetais utilizados: tubérculo de batata inglesa (*Solanum tuberosum* L.) e raízes tuberosas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), beterraba (*Beta vulgaris* L.) e cenoura (*Daucus carota* L.). Vegetais facilmente encontrados no comércio de hortícolas e, principalmente, devido ao armazenamento de carboidratos e presença de diversidade de nutrientes, tais como: K, N, P, Mg, Ca e S (Echer et al., 2009). Os órgãos vegetais foram descascados e fatiados em espessura de 5mm sendo que 150g desses substratos foram colocados em beckers com capacidade de 500mL. Os beckers foram fechados com papel alumínio e autoclavados por 30min. Posteriormente, um disco de 10 mm de diâmetro de meio de cultura BDA contendo micélio do fungo foi colocado na região central do becker sobre os substratos vegetais.

Os beckers foram colocados em câmara climatizada, com temperatura de 22 $\pm$ 2 ºC. Após 15 dias foi realizada a retirada do excesso de líquido formado nos beckers que continham como substrato: cenoura, beterraba e batata inglesa. Aos 30 dias após a instalação do experimento os escleródios foram retirados dos beckers e os restos de substrato que ficaram aderidos foram retirados com pinças e agulhas histológicas, com o uso de água destilada e esterilizada quando necessário. Essas estruturas foram deixadas para secar por 5 horas sobre papel filtro, em câmara de fluxo laminar. A avaliação dos escleródios produzidos constou do número de estruturas e medidas de comprimento (mm), largura (mm), área (mm^2) e massa (mg).

Os resultados quanto ao número de escleródios foram submetidos à análise de variância pelo teste F e ao teste de Duncan para a comparação de médias com o auxílio do programa estatístico ASSISTAT. Para as variáveis: comprimento, largura, área e massa, foi realizada análise de frequência dos dados, por meio do Programa Microsoft Excel.

Revista Agrarian
ISSN: 1984-2538

De acordo com a análise dos dados observou-se que ocorreu diferença significativa entre os tratamentos, o substrato vegetal à base de batata inglesa apresentou maior número de escleródios, em torno de 23 a 35% a mais na produção dessas estruturas quando comparado aos demais substratos (Tabela 1). Lima et al. (1997) também encontraram no substrato de batata inglesa o maior número de escleródios de diferentes isolados de *S. sclerotiorum.* Entretanto, Garcia et al. (2012) ao utilizarem vários tipos de vegetais como substrato, observaram que ocorreu maior crescimento de escleródios sobre batata doce do que em batata inglesa e cenoura, na proporção de 7,2 e 46,4%, respectivamente.

A base nutricional dos substratos pode ter interferido na produção maciça das estruturas de resistência do fungo, pois Rai & Agnihotri (1971), avaliando a produção de escleródios sobre oito meios de cultura contendo agar, encontraram que o patógeno pode utilizar várias fontes de carbono, tais como: maltose, sacarose, d-glicose, lactose, d-galactose, glicerol e manitol. Os autores complementam que d-glicose foi observada como sendo a melhor fonte de carbono para formação de escleródios. Dessa forma, pode-se acrescentar que a batata inglesa apresenta altos teores de glicose e amido, de acordo com Silva et al. (2013), 71,13% e 64,01%, respectivamente, podendo ser essa uma das explicações para o maior desenvolvimento das estruturas de resistência nesse substrato. Além disso, o substrato pode interferir nos escleródios, quanto à sua constituição química e capacidade de produzir germinação carpogênica, porém não foram objetivos desse trabalho. Costa & Costa (2006), observaram que o substrato de cenoura picada e arroz com casca foram eficientes na produção quantitativa de escleródios, porém os produzidos em arroz originaram maior número de apotécios quando enterrados no solo. Segundo Jensen et al. (2008), quando inocularam dois isolados de *S sclerotiorum* em raízes tuberosas de cenouras silvestres e cultivadas, observaram que ocorreu a formação de maior número de escleródio nas cultivadas e ocorreram diferenças significativas quanto à produção de escleródios entre os dois isolados de *S. sclerotiorum*.

Tabela 1. Número de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* produzidos em cinco substratos vegetais: mandioca, batata-doce, beterraba, cenoura e batata inglesa.

Substrato vegetal	Número total de escleródios
Mandioca	259 b*
Batata-doce	306 ab
Batata inglesa	397 a
Beterraba	281 b
Cenoura	264 b
CV (%)	

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade

Objetivou-se com esse trabalho a produção maciça de escleródios para serem utilizados em experimentos com o fitopatógeno, porém buscando quantidade aliada à homogeneidade morfológica, sendo fatores importantes e necessários para a escolha das estruturas no desenvolvimento de pesquisas. Um exemplo de pesquisa que apresenta necessidade dessas estruturas é o teste de iscas (Ethur et al., 2005; Ethur et al., 2014) quando se utilizam os escleródios como iscas para o isolamento de microrganismos antagônicos.

O escleródio padrão, produzido em maior quantidade pelo fitopatógeno, ou seja, mais de 50% de unidades, sobre os cinco substratos vegetais foi: comprimento de 5 a 10 mm, largura de 2 a 4 mm, área de 1 a 2 mm² e massa de 0 a 1 mg (Tabela 2). Rai & Agnihotri (1971), avaliando a produção de escleródios sobre oito meios de cultura contendo agar, observaram que o comprimento ficou no intervalo de 1 a 6mm, para todos os meios de cultura. Com relação a massa, também ocorre diversidade de acordo com o substrato onde o fitopatógeno se desenvolve e isso foi observado por Jensen et al. (2008), que após inoculação de micélio de *S. sclerotiorum* em raízes tuberosas de cenoura, observaram que a massa dos escleródios formados ficou entre 12 e 18 mg para as cultivares silvestre e de 4 mg para a cultivar Bolero. Budge & Whipps (2001), concluíram que ocorre germinação carpogênica em escleródios de *S. sclerotiorum* com menos de 10 mg de massa, portanto, os escleródios

Revista Agrarian
ISSN: 1984-2538

formados podem ser utilizados em experimentos que objetivam a germinação carpogênica.

Tabela 2. Distribuição de frequências (classes) das variáveis: Comprimento (mm), largura (mm), relação comprimento x largura (mm^2) e massa (mg) de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum,* produzidos em cinco substratos vegetais: mandioca, batata-doce, beterraba, cenoura e batata inglesa.

Variável Analisada	Classe - frequência	Substrato Vegetal* (número de escleródios - %)				
		Mandioca	Batata doce	Batata inglesa	Beterraba	Cenoura
Comprimento dos escleródios (mm)	I - 0>x ≤5	89 – 34,5	150 – 49,0	101 – 25,4	70 – 24,9	82 – 31,1
	II - 5>x≤10	133 – 51,4	126 – 41,2	241 – 60,7	171 – 60,8	135 – 51,1
	III - 10>x≤15	30 – 11,7	28 – 9,1	47 – 11,8	34 – 12,1	33 – 12,5
	IV - 15>x≤20	6 – 2,4	3 – 1,0	6 – 1,5	4 – 1,4	13 – 4,9
	V- 20>x≤25	0 – 0	2 – 0,6	1 – 0,2	2 – 0,7	1 – 0,4
	VI - 25>x≤30	0 – 0	0 – 0	1 – 0,2	0 – 0	0 – 0
	VII-30>x≤35	0 – 0	1 – 0,3	0 – 0	0 – 0	0 – 0
Largura dos escleródios (mm)	I - 0>x≤2	25 – 9,9	55 – 17,9	35 – 8,8	19 – 6,7	49 – 18,5
	II -2>x≤4	134 – 51,8	182 – 59,4	222 – 55,9	159 – 56,6	137 – 51,9
	III -4>x≤6	90 – 34,7	68 – 22,2	137 – 34,5	101 – 35,9	76 – 28,8
	IV -6>x≤8	9 – 3,6	5 – 1,6	3 – 0,8	2 – 0,7	2 – 0,76
Área dos escleródios (mm^2)	I - 0>x≤1	1 – 0,4	0 – 0	0 – 0	1 – 0,4	0 - 0
	II - 1>x≤2	203 – 78,5	255 – 83,3	285 – 71,8	188 – 66,9	204 – 77,3
	III - 2>x≤3	50 – 19,5	45 – 14,6	92 – 23,1	79 - 28,1	51 – 19,3
	IV - 3>x≤4	4 – 1,6	10 – 3,3	20 – 5,0	13 – 4,6	8 – 3,0
Massa de escleródios (mg)	I - 0>x≤1	214 – 82,7	281 – 91,8	371 – 93,4	262 – 93,2	230 – 87,1
	II - 1>x≤2	35 – 13,7	20 – 6,5	22 – 5,5	16 – 5,7	24 – 9,1
	III - 2>x≤3	6 – 2,4	5 – 1,5	4 – 1,0	3 – 1,1	5 – 1,9
	IV - 3>x≤4	3 – 1,2	0 – 0	0 – 0	0 – 0	4 – 1,5
	V - 4>x≤5	0 – 0	1 – 0,3	0 – 0	0 – 0	1 – 0,4
	VI - 5>x≤6	0 – 0	2 – 0,6	0 – 0	0 – 0	0 – 0
	VII - 6>x≤7	0 – 0	1 – 0,3	0 – 0	0 – 0	0 – 0

*Raízes e caule

Contudo, de acordo com os resultados encontrados, observou-se que o substrato que apresentou maior número de escleródios foi à base de batata inglesa, porém ocorreu um padrão de comprimento (maioria entre as classes I e II), largura (classes II e III), área (classe II e III) e massa (classes I e II), no desenvolvimento de escleródios, que não levou em consideração os substratos vegetais testados. A produção de escleródios quanto ao número é fator importante, porém o determinante pode está relacionado com o tamanho dessas estruturas, dependendo do objetivo do trabalho que necessita da produção maciça de escleródios. Portanto, os substratos vegetais: batata inglesa, batata doce, cenoura, beterraba e mandioca, podem ser utilizados na produção maciça de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* para serem usados em experimentos com o fitopatógeno.

Referências

ADAMS, P.B.; AYERS, W.A. *Sporidesmium sclerotivorum*: distribution and function in natural biological control of sclerotial fungi. **Phytopathology,** v. 71, p. 90-93, 1981.

BUDGE, S. P.; WHIPPS, J. M. Potential for integrated control of *Sclerotinia sclerotiorum* in glasshouse lettuce using *Coniothyrium minitans* and reduced fungicide application. **Phytopathology**, v. 91, p. 221–227, 2001.

COSTA, G.R.; COSTA, J.L.da S. Influência do solo e de substratos para produção de escleródios na germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Tropical,** v. 36, n. 2, p. 83-87, 2006.

ECHER, F. R.; DOMINATO, J. C.; CRESTE, J.; SANTOS, D. H. Fertilização de cobertura com boro e potássio na nutrição e produtividade da batata-doce. **Horticultura Brasileira,** v.27, n.2, p. 171-175, 2009.

ETHUR, L.Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.F.B.; SILVA, A.C.F.; STEFANELO, D.R.; ROCHA, E.K. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.2, p.127-133, 2005.

ETHUR, L.Z.; COPATTI, A.S., FIPKE, G.M., CALVANO, C.C.A.; PAZINI, J.B. Micobiota parasitária de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* isolada de solos da fronteira oeste do Rio Grande do Sul. **Arq. Inst. Biol**., v.81, n.1, p.62-67, 2014

FERRAZ, L.C.L.; NASSER, L.C.B.; CAFE-FILHO, A.C. Viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* e incidência de fungos antagonistas em solo de Cerrado. **Summa Phytopathologica** v.37, n.4, p. 208-210, 2011.

GARCIA, R.A.; JULIATTI, F.C.; CASSEMIRO, T.A. Produção de escleródios de Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) De Bary em meio de cultura. **Biosci J.**, v.28, n.1, p. 1-7, 2012.

ILLIPRONTI JR, R.A.; MACHADO, J. C. Antagonismo de fungos a *Sclerotinia sclerotiorum* em soja e feijão. **Fitopatologia Brasileira,** v. 18, n. 2, p. 162-166, 1993.

JENSEN, B.D.; FINCKH, M.R.; MUNK, L.; HAUSER, T.P. Susceptibility of wild carrot (*Daucus carota* ssp. *carota*) to *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal Plant Pathology**, v. 122, p.359–367, 2008.

LE TOURNEAU, D. Morphology, cytology and physiology of Sclerotinia species in sulture. **Phytopathology,** v.69, p. 887–890, 1979.

LIMA, M.L.R.; STOCCO, R.J.; TRENTO, S.M. Avaliação de diferentes substratos na produção de escleródios de Sclerotinia *sclerotiorum.* In: 20º Congresso Paulista de Fitopatologia, 1997. São Paulo - SP. **Anais…** Botucatu: Sociedade Paulista de Fitopatologia, 1997 p.64.

LIU, Y; PAUL, V.H. Studies on the germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 114, n. 1, p. 14-19, 2007.

MATHERON, M.E.; PORCHAS, M. Influence of soil temperature and moisture on eruptive germination and viability of sclerotia of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum*. **Plant Disease,** v. 89, p. 50-54, 2005.

RAI, R.A.; AGNIHOTRI, J.P. Influence of nutrition and ph on growth and sclerotia formation of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary from *Gaillardia pulchella* Foug. **Mycopathologia e Mycologia Applicata**, v. 43, n.1, p. 89-95, 1971.

SERRA, I. M. R. S.; SILVA, G. S. Caracterização biológica e fisiológica de isolados de *Sclerotium rolfsii* obtidos de pimentão no Estado do Maranhão. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.61-66, 2005.

SILVA, B.H.da; NASCIMENTO, A.K.V.; SILVA, E.J.; COSTA, R.F.de M.; CELESTINO, P.C.G.. Teor de glicose e amido em tubérculos de batata inglesa (*Solanum tuberosum* L.). In: XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2013. Recife - PE. **Anais...** UFRPE, Recife, 09 a 13 de dezembro de 2013.

VENTUROSO, L.R.; BACCHI, L.M.A.; GAVASSONI, W.L.; CONUS, L.A.; PONTIM, B.C.A. Relação de massa e localização do escleródio no solo com germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Summa Phytopathologica**, v.40, n.1, p.29-33, 2014.

ZAZZERINI, A.; TOSI, L. Antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology,** v. 34, p. 415-421, 1985.