



Método para inoculação de *Sclerotium rolfii* em tomateiro¹

Inoculation method of Sclerotium rolfii in tomato

Rosianne Nara Thomé Barbosa^{2*}, Bernardo de Almeida Halfeld-Vieira³, Kátia de Lima Nechet⁴,
Giovanni Ribeiro de Souza⁵

Resumo - O objetivo deste trabalho foi determinar o tipo e concentração de inóculo mais adequados para induzir a murcha-de-esclerócio, sem provocar ferimentos em plantas de tomateiro. Os tratamentos foram: 2, 4, 8 e 16 g de arroz colonizado L⁻¹ incorporados ao solo; 2, 4, 6 e 8 escleródios ou discos de micélio depositados na superfície do solo. A utilização de 8 g de arroz colonizado L⁻¹ de solo demonstrou ser a concentração e o tipo de inóculo ideal para experimentos que visem a inoculação do patógeno sem incitação de ferimento. A deposição de discos de micélio e escleródios não ocasionaram incidência da doença.

Palavras-chave - *Solanum lycopersicum*. *Lycopersicon esculentum*. Produção de inóculo. Fungo de solo.

Abstract - The objective of this work was to determinate type and concentration of inoculum concentration suitable to inducing southern blight in tomato plants, without causing injury. The performed treatments consisted of 2, 4, 8, and 16 g of colonized rice grains.L⁻¹ soil; 2, 4, 6 and 8 sclerotia or mycelium disks deposited in soil surface. The incorporation of 8 g of colonized rice grains.L⁻¹ soil proved to be the type of inoculum concentration ideal for experiments aimed to induce southern blight with no injury in tomato plants. Deposition of mycelium disks or sclerotia did not result in disease.

Key words - *Solanum lycopersicum*. *Lycopersicon esculentum*. Inoculum production. Soilborne fungi.

*- Autor para correspondência

¹Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor apresentada à Universidade Federal de Roraima - Programa de Pós-Graduação em Agronomia (POSAGRO) em parceria com a EMBRAPA-Roraima.

²Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Estado de Roraima, rosiannethome@click21.com.br

³Bolsista produtividade em pesquisa do CNPq. Embrapa Roraima, BR 174, Km 08, Distrito Industrial, Caixa Postal 133, Boa Vista-RR, Brasil, CEP 69.301-970, halfeld@cpafrr.embrapa.br

⁴Embrapa Roraima, katia@cpafrr.embrapa.br

⁵Embrapa Roraima, giovanni@cpafrr.embrapa.br

Introdução

A murcha-de-esclerócio causada pelo fungo habitante do solo *Sclerotium rolfsii* Sacc. é uma doença de difícil controle (AGRIOS, 2005) que predomina em regiões de clima tropical e subtropical e ocasiona tombamento, podridão radicular e murcha em mais de 500 espécies de plantas cultivadas no mundo (PUNJA, 1985).

Apesar da sua importância, a definição de um método para inoculação da doença visando o estabelecimento das condições experimentais adequadas para expressão dos sintomas típicos em condições mais próximas às que ocorrem em campo não está bem estabelecido. Os métodos usados por diferentes autores têm sido utilizados sem critérios pré-determinados, havendo diversas variações nos procedimentos de inoculação. Alguns induzem condições altamente propícias à infecção pelo patógeno, como deposição de escleródios sobre ou junto às sementes (MATSUMOTO *et al.*, 2000; BLUM *et al.*, 2003), ou diretamente em ferimentos provocados nas plantas (DANTAS *et al.*, 2002). Outros usam fontes ricas em carbono para promover a infestação do solo com inóculo do fungo, induzindo a ocorrência da doença sem causar ferimentos (FALCÃO *et al.*, 2005; FLORES-MOCTEZUMA *et al.*, 2006) e a deposição de discos de micélio diretamente no colo da planta (PRATT e ROWE, 2002). Portanto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de determinar qual o tipo e concentração de inóculo mais adequados para induzir a murcha-de-esclerócio, sem provocar ferimentos em plantas de tomateiro.

Material e métodos

O experimento foi conduzido no período de maio a junho de 2007 no Laboratório de Fitopatologia e em casa-de-vegetação com temperatura controlada a 28-29 °C, na Embrapa Roraima, Boa Vista, Roraima, Brasil.

Para ajustar a concentração de inóculo ideal para causar a máxima intensidade da doença, foram utilizados grãos de arroz colonizados, escleródios e discos de micélio. Como padrão, foi usado o isolado de *S. rolfsii* 258, obtido de pimentão e mantido pela Coleção de Fungos Fitopatogênicos da Embrapa Roraima.

Grãos de arroz beneficiados foram submersos em água destilada por duas horas e em seguida autoclavados a 120 °C durante 20 min, segundo metodologia adaptada de Serra e Silva (2005). Posteriormente, foram distribuídos sobre colônias de *S. rolfsii* crescidas em placas de Petri com meio de cultura Batata-Dextrose-Agar (BDA) durante sete dias em incubadora a 25 °C em regime de fotoperíodo de 12 horas. Após este período, os grãos já se encontravam colonizados em sua totalidade.

A produção dos escleródios e discos de micélio foi feita mediante o cultivo do patógeno, por meio de discos de micélio de 0,5 cm em placas de Petri com BDA durante sete dias em incubadora a 25 °C em regime de fotoperíodo de 12 horas. Os escleródios foram retirados das colônias e transferidos para placas de Petri esterilizadas. Já as colônias do fungo foram mantidas nas placas para posteriormente serem retirados os discos de micélio.

Mudas de tomateiro da cv. Santa Clara foram semeadas em bandejas de isopor com substrato Plantmax®, sendo transplantadas com raiz nua para vasos plásticos de 0,5 L contendo solo esterilizado quando apresentavam duas folhas compostas em crescimento.

A infestação do solo com escleródios ou discos de micélio foi feita depositando-se os propágulos sobre a superfície do substrato a 1 cm da planta, com 2, 4, 6 ou 8 propágulos por tratamento. Os grãos de arroz colonizados foram incorporados e homogeneizados ao solo antes do transplante das mudas nas concentrações de 2, 4, 8 ou 16 g L⁻¹ de solo, por tratamento. Foram utilizadas 8 plantas por tratamento, sendo uma planta por vaso, e as testemunhas foram constituídas por discos de BDA e grãos de arroz não colonizados. Após a infestação, o solo foi irrigado uma vez ao dia.

As avaliações foram realizadas até 14 dias após a infestação do solo, contabilizando-se diariamente as plantas com sintomas de necrose e constrição do colo devido à murcha-de-esclerócio. Os resultados foram analisados por análise de regressão (MADDEN *et al.*, 2007) utilizando-se os pacotes estatísticos SigmaPlot 8.02 e Microsoft Excel 2000.

Resultados e discussão

Os únicos tratamentos em que houve incidência da doença foram os inoculados com arroz beneficiado colonizado. Os experimentos com a deposição de discos de micélio e escleródios foram repetidos, mantendo-se os resultados de insucesso destes propágulos como fonte de inóculo para as condições experimentais. A incidência da doença em função da concentração de inóculo no solo foi ajustada ao modelo monomolecular (HARTMAN *et al.*, 1999), segundo a equação: $y = 96,2748 * (1 - \exp(-0,2877 * x))$, com $R^2 = 0,96$ (Figura 1). Verifica-se que a partir da concentração de 8 g L⁻¹ há uma tendência de estabilização da curva, atingindo o valor máximo de incidência da doença.

A comparação das dissimilaridades estatísticas das retas realizada por Teste t (NUTTER Jr., 1997; MADDEN *et al.*, 2007), demonstrou diferenças entre os valores de intercepto. Este parâmetro indica a estimativa

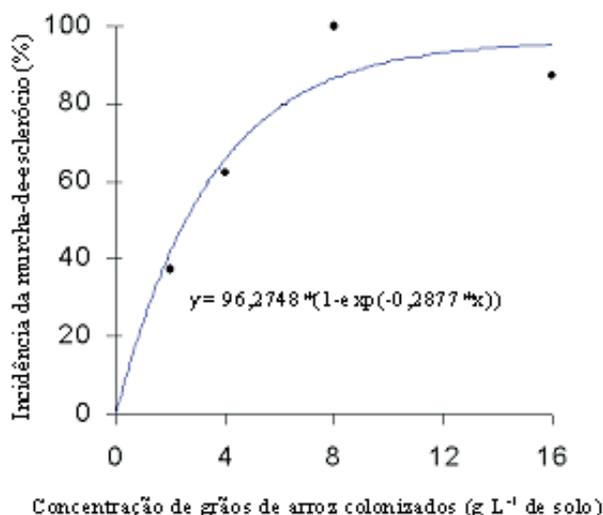


Figura 1 - Incidência da murcha-de-esclerócio em função da concentração de grãos de arroz colonizados.

da incidência inicial da doença. Na Tabela 1 observa-se que, as concentrações de inóculo de 8 g e 16 g de arroz colonizado L⁻¹ de solo, proporcionaram intensidade de doença inicial superior à 2 g L⁻¹, logo esta concentração demanda maior período para que uma epidemia se inicie. Para o coeficiente angular da reta, que corresponde à taxa de progresso da doença (MADDEN *et al.*, 2007), observa-se que há diferença estatística entre os valores das concentrações de 8 e 2 g de inóculo L⁻¹ de solo (Tabela 1). Portanto, a concentração de inóculo de 8 g L⁻¹ apresenta incidência maior em um mesmo período de tempo, quando comparado à 2 g L⁻¹ e, por conseguinte, uma maior taxa de progresso da doença.

Os dados da incidência da doença em função da concentração de inóculo aos 14 dias após a infestação do solo demonstra que existe uma tendência em se atingir o

máximo da incidência da doença em concentrações a partir de 8 g de arroz colonizado L⁻¹ de solo, corroborando com os dados observados nas análises de regressão linear.

Os resultados para o uso de arroz colonizado como substrato para inoculação de *S. rolfsii* podem ser comparados com os obtidos por Falcão *et al.* (2005), que verificaram que 5 g de arroz colonizado kg⁻¹ de solo foi um dos substratos mais eficientes para avaliar a intensidade da murcha-de-esclerócio em soja, acarretando em 100% de mortalidade. Entretanto, isso não é verificado quando utilizadas 4 g de arroz colonizado kg⁻¹ de solo para avaliar a incidência em tomateiro. Essa concentração ocasionou 60% de mortalidade após 14 dias de inoculação.

Matsumoto *et al.* (2000) e Blum *et al.* (2003) verificaram que dois escleródios junto e sobre sementes de feijoeiro proporcionaram incidência da doença variando entre 51 a 72% e de 12 a 94%, respectivamente. Dantas *et al.* (2002) constataram que 10 escleródios sobre o colo de feijoeiro levemente ferido foram suficientes para causar a doença. Porém, em tomateiro, depositados de dois a oito escleródios a 1,0 cm do colo da planta, não houve ocorrência da doença, demonstrando uma discordância com os resultados obtidos por Matsumoto *et al.* (2000), Dantas *et al.* (2002) e Blum *et al.* (2003).

Resultados obtidos para o método de infestação do solo com discos de micélio mostraram-se semelhantes aos observados em soja por Falcão *et al.* (2005). Em ambos os experimentos, não houve mortalidade de plantas após 14 dias de inoculação, indicando que as concentrações e o tipo de inóculo não são os mais adequados para avaliar a incidência da doença nas duas culturas estudadas. Além disso, Falcão *et al.* (2005) indicaram o uso de arroz como substrato para o cultivo de *S. rolfsii* e veiculação de inóculo para infestação de solo, demonstrando concordância com os resultados obtidos neste trabalho, no qual o arroz beneficiado foi o único substrato de cultivo que proporcionou a incidência da doença em tomateiro, sem causar fermentos nas plantas.

Tabela 1- Comparação das dissimilaridades estatísticas das retas realizada por teste t para os valores de intercepto e do coeficiente angular da reta

Concentrações de inóculo	Intercepto			Coeficiente angular da reta		
	2 g L ⁻¹	4 g L ⁻¹	8 g L ⁻¹	2 g L ⁻¹	4 g L ⁻¹	8 g L ⁻¹
2 g L ⁻¹	-	-	-	-	-	-
4 g L ⁻¹	-1,70	-	-	1,73	-	-
8 g L ⁻¹	2,60*	0,93	-	2,98*	-1,21	-
16 g L ⁻¹	3,33*	0,93	-0,17	2,03	0,017	1,33

Valores de t calculado acompanhados de asterisco diferem estatisticamente a $p \leq 0,05$.

Conclusão

A infestação do solo a partir da incorporação de 8 g de arroz colonizado L⁻¹ é um método indicado para experimentos que visem a inoculação do patógeno, sem causar fermentos em plantas de tomateiro.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, pelo auxílio financeiro (processo: 470433/2007-8) e pela concessão de bolsa a Bernardo A. Halfeld-Vieira (processo: 303081/2007-4).

Literatura científica citada

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. San Diego: Elsevier 2005. 922p.

BLUM, L. E. B. *et al.* Reação de genótipos de *Phaseolus vulgaris* à podridão do colo e ao oídio. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.96-100, 2003.

DANTAS, S. A. F. *et al.* Identificação de fontes de resistência em feijoeiro a *Sclerotium rolfsii*. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.528-531, 2002.

FALCÃO, J. V. *et al.* Estabelecimento de metodologia para contaminação de solo com propágulos dos fungos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii*, e expressão de doença em soja. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 9p. (**Comunicado Técnico, 135**).

FLORES-MOCTEZUMA, H. E. *et al.* Pathogenic diversity of *Sclerotium rolfsii* isolates from Mexico, and potential control of southern blight through solarization and organic amendments. **Crop Protection**, v.25, p.195-201, 2006.

HARTMAN, J. R.; PARISI, L.; BAUTRAIS, P. Effect of leaf wetness duration, temperature, and conidial inoculum dose on apple scab infection. **Plant Disease**, v.86, p.531-534, 1999.

MADDEN, L.V.; HUGHES, G.; VANDEN BOSCH, F. **The study of plant disease epidemics**. St. Paul: APS Press, 2007. 421p.

MATSUMOTO, M. N. *et al.* Efeito do substrato de cultivo na produção de esclerócios e na patogenicidade de *Sclerotium rolfsii*. **Summa Phytopathologica**, v.26, p.91-94, 2000.

NUTTER JR, F.W. Quantifying the temporal dynamics of plant virus epidemics: a review. **Crop Protection**, v.16, p.603-618, 1997.

PRATT, R. G.; ROWE, D. E. Enhanced resistance to *Sclerotium rolfsii* in populations of alfalfa selected for quantitative resistance to *Sclerotinia trifoliorum*. **Phytopathology**, v.92, p.204-209, 2002.

PUNJA, Z. K. The biology, ecology, and control of *Sclerotium rolfsii*. **Annual Review of Phytopathology**, v.23, p.97-127, 1985.

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.