

Compatibilidade Micelial e Efeito de Temperaturas sobre o Crescimento Micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Renata Maria de Oliveira, Marcos Gomes da Cunha
Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás
74001-970, Brasil
renata_oliveira89@hotmail.com e mgc@agro.ufg.br

PALAVRAS-CHAVE: isolados, variabilidade genética, temperatura.

1 INTRODUÇÃO

O complexo Soja (*Glycine max* L. Merrill) é responsável por uma revolução sócio-econômica e tecnológica no Brasil. O país é o segundo maior produtor mundial de soja atrás apenas dos EUA, no ano de 2009 a produção brasileira ultrapassou 57 milhões de toneladas (Fonte: IBGE), enquanto que na safra 2010 o Brasil colheu um recorde de 68,7 milhões de toneladas (Fonte: EMBRAPA SOJA). Apesar dos bons resultados para as últimas safras, ainda há diversos fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos, e entre os principais estão as doenças.

A prodridão branca da haste da soja, causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary é, atualmente, uma das principais doenças da cultura pelos prejuízos ocasionados nas últimas safras e pela dificuldade de controle. A rápida disseminação da doença pelos campos de cultivo deve-se a exploração de outras culturas suscetíveis, cultivadas anteriormente a soja, condições climáticas favoráveis (alta umidade e temperatura amena), e contaminação das sementes com micélios do fungo ou com sua estrutura de resistência – escleródio.

O fungo é considerado um dos patógenos mais importantes no mundo e está distribuído em todas as regiões produtoras, sejam elas temperadas, tropicais ou subtropicais (LEITE, 2005). Embora outros fatores estejam envolvidos, a flutuação de umidade pode ser um estímulo importante para a sua germinação (Cook et al., 1975). Segundo Adams; Ayers (1979), os escleródios podem sobreviver no solo por até cinco anos.

A quantidade mínima de escleródios no solo necessária para induzir um ataque significativo da doença no campo, ainda não foi determinada com precisão. Segundo Schwartz e Steadman (1978), baixa populações de escleródios (0,2/kg de solo) produziu suficiente inóculo para causar uma epidemia moderadamente severa. *S. sclerotiorum* pode sobreviver em sementes infectadas como micélio dormente no tegumento e nos cotilédones por três anos ou mais (Tu, 1988).

Apesar da importância que o fungo *S. sclerotiorum* vem assumindo em campos de produção de soja, e demais espécies hospedeiras, pouco estudos têm sido realizados no Brasil para se conhecer a variabilidade genética de *S. sclerotiorum* e o comportamento de isolados à diferentes temperaturas. A variabilidade genética de *S. sclerotiorum* tem sido investigada através de grupos de compatibilidade micelial e marcadores moleculares, sendo observado a existência de um único clone em campos com distâncias geográficas curtas ou longas, e mais de clone em um único campo (Kohli et al., 1992). Meinhardt et al. (2002) observaram dois grupos de compatibilidade entre 23 isolados obtidos de uma área sob pivô central próximo à Guaíra-SP. Kull et al. (2004) constataram a existência de 42 grupos de compatibilidade micelial entre 299 isolados de *S. sclerotiorum*, provenientes de Diverse, DeKalb, Watseka Sets e Argentina.

Atallah et al. (2004), verificaram que as temperaturas de 18°C e 25°C foram mais favoráveis ao desenvolvimento de *S. sclerotiorum*, comparadas às temperaturas de 10°C e 33°C. Diante da falta de informações quanto à variabilidade genética e temperatura favorável ao crescimento micelial torna-se necessários que estudos sejam realizados para se conhecer melhor o fungo *S. sclerotiorum*.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar a variabilidade genética de isolados de *S. sclerotiorum*, obtidos de diferentes cidades brasileiras, por meio de compatibilidade micelial e testar os isolados quanto ao crescimento micelial, grupos de compatibilidade micelial, às temperaturas de 20°C e 25°C.

3. METODOLOGIA

3.1 Coleção de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*

Os isolados obtidos para a realização do experimento foram coletados em diferentes regiões produtoras de soja: Uberlândia - MG, Patrocínio - MG, Chapadão do Sul - MG, São Miguel do Passa Quatro - GO, Silvânia - GO, Anápolis - GO, Rio Verde - GO e Água Fria de Goiás - GO. Em cada localidade foram coletados aproximadamente 50 isolados por local, em um mesmo campo de soja, na forma de escleródios, a uma distância mínima de 10 metros entre pontos. Somente na cidade de Silvânia que foram coletadas duas amostras na mesma propriedade.

Para obtenção da coleção de isolados para condução dos experimentos, os escleródios foram desinfestados em álcool 96% e hipoclorito de sódio a 2% por 60 segundos em cada uma das soluções, sendo posteriormente depositados em placas de Petri, contendo meio Ágar-Água, e incubados em B.O.D., sob condições de escuro e temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Logo após o início da germinação dos escleródios, discos de 6 mm de diâmetro, contendo hifas do fungo, foram retirados das bordas das colônias e depositados em placas de Petri, contendo meio de cultura BDA (Batata Dextrose Água) e incubados, em B.O.D, nas mesmas condições descritas anteriormente.

3.2 Compatibilidade micelial entre isolados de *S. sclerotiorum*

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com duas repetições e 25 isolados por local, sendo que uma repetição foi realizada em meio de cultura MPM (meio modificado de Patterson's) e a outra em meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar). O meio de cultura MPM foi preparado segundo Schafer & Kohn (2006), contendo $0,68 \text{ g.L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $0,50 \text{ g.L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,15 \text{ g.L}^{-1} \text{ KCl}$, $1,0 \text{ g.L}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$, $18,4 \text{ g.L}^{-1} \text{ D-glucose}$, $0,50 \text{ g.L}^{-1}$ extrato de levedura, $15,0 \text{ g.L}^{-1}$ ágar, por litro de água destilada, $200 \mu\text{L}$ de solução de elementos traços contendo: 95 mL água destilada, 5,0 g ácido cítrico monohidratado, 5,0 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4) \cdot 2,6\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g $\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g H_3BO_4 , 0,05 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e, 1 mL CHCl_3 como preservativo da solução, armazenada a temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. O meio de cultura BDA foi preparado segundo Zauza et al. (2007), contendo $20 \text{ g.L}^{-1} \text{ D-glucose}$, 17

g.L⁻¹ ágar e 200 g batata. Antes de verter os meios de cultura nas placas de Petri foram adicionados 1.000 µL de corante, coloração vermelho morango e marca Mix Coralim®, para facilitar a visualização das reações de incompatibilidade.

Para implantação dos experimentos, os isolados foram cultivados em meio BDA por 5 dias, sob condições de escuro e temperatura de 20 ± 2°C. Decorrido este período, discos de micélio de 6 mm de diâmetro foram retirados da borda da colônia de *S. sclerotiorum* e, depositados, equidistantemente, 3 discos por placa de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo meio de cultura, sendo todos os isolados pareados consigo mesmo e com os demais isolados. Após o plaqueamento, as placas de Petri foram incubadas em B.O.D, sob condições de escuro e temperatura de 20 ± 2°C. As reações de interação micelial foram avaliadas 7 dias após incubação, considerando reação incompatível quando ocorreu a formação de linha vermelha na superfície ou reverso das colônias e um espaço entre as colônias, linha vermelha na superfície ou reverso das colônias e, micélio aéreo na linha de interação.

3.3 Efeito da temperatura no crescimento micelial de isolados de *S. sclerotiorum*

Os grupos de compatibilidade micelial resultantes do experimento acima (item 3.2) foram testados sob efeito das temperaturas de 20°C e 25°C, ambas em condições de escuro e fotoperíodo de 12 horas, quanto ao crescimento micelial. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado e quatro repetições, sendo que o número de isolados provenientes das oito localidades totalizaram em 22 isolados.

Para a condução do experimento, os isolados foram cultivados em meio de cultura BDA por 5 dias, mantidos em B.O.D. nas condições de escuro e 25°C. Posteriormente, foram retirados, da borda da colônia, discos de 6 mm de diâmetro e depositados em placas de Petri, contendo meio BDA. As placas foram incubadas nas condições do presente estudo, descritas anteriormente.

As avaliações do crescimento micelial foram iniciadas 24 horas após a incubação, medindo-se o diâmetro das colônias, e encerradas quando o fungo atingiu todo o diâmetro da placa de Petri, 9 cm. Os dados referentes ao crescimento micelial foram avaliados com 48 horas de incubação.

4 RESULTADOS

4.1 Compatibilidade micelial entre isolados de *S. sclerotiorum*

Para o experimento de compatibilidade micelial utilizou-se dois meios de cultura (MPM e BDA), pois em estudos prévios (dados não publicados), verificou-se que em alguns casos o meio MPM pode retardar o crescimento do fungo, dificultando a avaliação, enquanto que no meio de cultura BDA isto não acontece. Entretanto as reações de incompatibilidade são mais bem visualizadas em meio de cultura MPM, acarretando a necessidade de se trabalhar com estes dois meios de cultura em trabalhos de compatibilidade micelial, para melhor discernimento e confiabilidade das reações miceliais.

Em Rio Verde um grupo de compatibilidade foi formado pelo isolado 23 e o segundo grupo formado pelos demais isolados (Tabela 1). Em Uberlândia o isolado 18 se diferenciou dos demais constituindo-se um grupo e o outro grupo, composto pelos demais isolados (24 isolados) (Tabela 2). Em São Miguel do Passa Quatro identificou-se 4 grupos de compatibilidade micelial, sendo o primeiro grupo formado pelo isolado 10, o segundo formado pelo isolado 12, o terceiro formado pelo isolado 25 e o quarto grupo formado pelos demais isolados, totalizando 22 isolados (Tabela 3).

Em relação à população proveniente de Chapadão do Sul foram encontrados dois grupos de compatibilidade, sendo um grupo composto pelos isolados 1, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22 e 23 e o outro grupo formado pelos isolados 2, 3, 7, 9, 13, 14, 17, 24 e 25 (Tabela 4). Nesta área de Chapadão do Sul verifica-se a presença de dois clones, que de modo geral estão distribuídos de forma homogênea na área amostrada. Observando-se a Tabela 5 verifica-se que houve apenas um único grupo, o que parece existir um único clone na área amostrada em Água Fria. Em Anápolis observou-se a existência de dois grupos de compatibilidade, um grupo formado pelos isolados 2, 11 e 25 e o outro grupo formado pelos 22 isolados restantes (Tabela 6).

4.2 Efeito da temperatura no crescimento micelial de isolados de *S. sclerotiorum*

A interação entre isolados e temperaturas, em condições de escuro, foi significativa. Observando-se a Tabela 10 verifica-se que os isolados A22, A51, ANPS24, B1, C45, PAT9, RV18, RV27, UDIA1 e UDIA11 cresceram mais à temperatura de 25°C do que 20°C. Em relação aos isolados A11, ANPS 22, C4, C57, C69.1, C69.2, CS30, FAF14, PAT 14 e PAT32 não houve diferença entre temperaturas sobre o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. Por outro lado, os isolados ANPS12 e CS30 desenvolveram melhor sob efeito da temperatura de 20°C. De modo geral, verifica-se que a temperatura de 25°C proporciona um crescimento micelial mais rápido do que a 20°C, em condições de escuro.

Tabela 10. Crescimento micelial de isolados de *S. sclerotiorum* sob efeito das temperaturas de 20°C e 25°C, em condições de escuro.

Isolados	Temperatura	
	20°C	25°C
A11	7,23 b A	8,40 a A
A22	4,84 a A	6,63 a B
A51	5,74 b A	7,71 a B
ANPS12	6,38 b B	3,15 d A
ANPS22	6,84 b A	6,24 b A
ANPS24	6,18 b A	7,98 a B
B1	6,23 b A	7,96 a B
C4	6,13 b A	7,05 a A
C45	4,09 a A	5,81 b B
C57	6,44 b A	6,05 b A
C69.1	6,68 b A	7,98 a A
C69.2	6,64 b A	7,98 a A
CS10	6,39 b B	4,73 c A
CS30	6,16 b A	7,35 a A
FAF14	6,76 b A	7,78 a A
PAT9	6,14 b A	7,59 a B
PAT14	6,84 b A	7,84 a A
PAT32	6,26 b A	7,13 a A
RV18	4,23 a A	6,96 a B
RV27	5,96 b A	7,51 a B
UDIA1	5,93 b A	7,96 a B
UDIA11	6,28 b A	8,34 a B

Médias seguidas de letras minúsculas, nas colunas, e letras maiúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 1% de significância.

A interação entre isolados e temperaturas, em condições de fotoperíodo de 12 horas, não foi significativa. Observando-se a Tabela 11 verifica-se que sob efeito da temperatura de 25°C, o fungo *S. sclerotiorum* cresce mais rápido (7,65 cm) do que a temperatura de 20°C (5,91 cm), em condições de fotoperíodo de 12 horas.

Tabela 11. Crescimento micelial de isolados de *S. sclerotiorum* sob efeito das temperaturas de 20°C e 25°C, em condições de fotoperíodo de 12 horas.

Isolados	Temperatura		Média
	20°C	25°C	
A11	7,36	8,34	7,85 a
A22	4,93	7,54	6,23 b
A51	6,08	8,35	7,22 a
ANPS12	4,43	5,41	4,92 c
ANPS22	6,41	8,40	7,41 a
ANPS24	5,96	8,40	7,18 a
B1	5,60	8,20	6,90 a
C4	5,73	7,50	6,61 a
C45	6,11	6,26	6,19 b
C57	5,24	8,15	6,69 a
C69.1	6,43	7,89	7,16 a
C69.2	6,59	8,40	7,49 a
CS10	4,99	8,96	5,98 b
CS30	6,48	8,34	7,41 a
FAF14	6,69	7,58	7,13 a
PAT9	6,05	6,59	6,32 b
PAT14	6,34	8,40	7,37 a
PAT32	5,90	7,49	6,69 a
RV18	4,44	6,56	5,50 c
RV27	6,45	6,63	6,54 a
UDIA1	5,83	8,35	7,09 a
UDIA11	6,10	8,40	7,25 a
Média	5,91 a	7,64 b	

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 1% de significância.

5 DISCUSSÃO

Por meio das análises de compatibilidade micelial pode verificar que existe variabilidade genética entre os isolados de *S. sclerotiorum* amostrados, em análises intrapopulacional. Entretanto, percebe-se que algumas regiões apresentam

maior diferenciação quanto a variabilidade genética do que outras, como se pode verificar na população de São Miguel do Passa Quatro (4 grupos), Chapadão do Sul (2 grupos), Anápolis (2 grupos), Patrocínio (2 grupos), Silvânia “A” (2 grupos), Uberlândia (2 grupos), Rio Verde (2 grupos), comparada com as populações de Água Fria (1 grupo) e Silvânia “B” (1 grupo). Kohli et al. (1992) relatam que em um único campo pode haver mais de um clone de *S. sclerotiorum*, o que parece ocorrer em certas regiões brasileiras.

Trabalhos realizados por Kohli et al. (1992) também demonstraram que em diferentes campos e distâncias geográficas relativamente longas pode-se verificar a presença de um único clone de *S. sclerotiorum*. Meinhardt et al. (2002) observaram dois grupos de compatibilidade entre 23 isolados obtidos de uma área sob pivô central próximo à Guaíra-SP. Kull et al. (2004) verificaram 42 grupos de compatibilidade micelial entre 299 isolados de *S. sclerotiorum*, provenientes de Diverse, DeKalb, Watseka Sets e Argentina.

Em relação às temperaturas pode-se observar que os isolados apresentam comportamento diferenciado quando submetidos às temperaturas de 20°C e 25°, sendo que a temperatura de 25°C foi a que mais favoreceu o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, tanto em condições de escuro como fotoperíodo de 12 horas. Os resultados do presente estudo condiz com os resultados de Atallah et al. (2004), uma vez que as temperaturas de 18°C e 25°C foram favoráveis ao desenvolvimento de *S. sclerotiorum*, comparadas às temperaturas de 10°C e 33°C.

6 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio de análises intrapopulacional de compatibilidade micelial, pode-se verificar que existe variabilidade genética entre os isolados de *S. sclerotiorum* amostrados. Estas informações podem contribuir em estudos de melhoramento genético da soja visando resistência à podridão branca da haste, pois os estudos devem levar em consideração a variabilidade genética existente no patógeno, bem como no manejo integrado da doença, pois existindo mais de um clone por campo, possivelmente medidas de controle também devem ser diferenciadas. Além disso, percebe-se que os isolados de *S. sclerotiorum* apresentam comportamento diferenciado às temperaturas de 20°C e 25°C, sendo que 25°C faz

com que o fungo desenvolva mais rápido. Em campo, temperaturas entre 20 a 25°C aliadas à alta umidade relativa favorece o desenvolvimento da doença, o que parece ser evidenciado neste estudo *in vitro*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, P.B.; AYERS, W. A. Ecology of *Sclerotinia species*. **Phytopathology**, v.69, p.896-898, 1979.

ATALLAH, Z. K., and Johnson, D. A. 2004. Development of *Sclerotinia* stem rot in potato fields in South-Central Washington. *Plant Dis.* 88:419-423.

COOK, D. P.; STEADMAN, J. R.; ANDERSON, F. N. Effect of modified plant architecture of Great Northern dry bean varieties (*Phaseolus vulgaris*) on white mold severity, and components of yield. **Plant Disease Report**, Beltsville, v. 58, p.379-382, 1975.

EMBRAPA SOJA. A soja. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=22&>. Acesso em 27 maio 2011.

IBGE. Produção Agrícola Municipal. Rio de Janeiro, v.36, p.1-93, 2009. Disponível em:<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2009/PAM2009_Publicacao_completa.pdf>. Acesso em 27 maio 2011.

KOLHI, Y.; MORRAL, A.A.; ANDERSON, J.B.; KOHN, L.C. Local and trans-Canadian clonal distribution of *Sclerotinia sclerotiorum* on Canola. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, n. 8, p. 875-880, 1992.

KULL, L.S.; PEDERSEN, W.L. Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 325-332, 2004.

LEITE, R.M.V.B.C. **Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja.** Londrina: Embrapa Soja, 2005. 3p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 76).

MEINHARDT, L.W.; NELSON, A.W.; BELLATO, C.M.; TSAI, S.M. Telomere and microsatellite primers reveal diversity among *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 211-215, 2002.

SCHWARTZ, H. F.; STEADMAN, J. R. Factors affecting sclerotium population of, and apothecium production by, *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 68, p. 383-388, 1978.

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**, Berlin, v.121, p.40-50, 1988.

ZAUZA, E.A.V.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2007, 382 p.