UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

IMPLICAÇÕES DA INOCULAÇÃO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM CULTURAS BIOENERGÉTICAS

LUCIANO DOS REIS VENTUROSO

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2012

IMPLICAÇÕES DA INOCULAÇÃO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM CULTURAS BIOENERGÉTICAS

LUCIANO DOS REIS VENTUROSO
Engenheiro Agrônomo

Orientadora: PROFª Drª LILIAN MARIA ARRUDA BACCHI

Co-Orientador: PROF. Ph.D. WALBER LUIZ GAVASSONI

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

Dourados
Mato Grosso do Sul
2012

IMPLICAÇÕES DA INOCULAÇÃO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM CULTURAS BIOENERGÉTICAS

por

Luciano dos Reis Venturoso

Tese apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de DOUTOR EM AGRONOMIA

Aprovado em: 30/08/2012

Profª Drª Lilian Maria Arruda Bacchi
Orientadora – UFGD/FCA

Prof. Ph.D. Walber Luiz Gavassoni
Co-Orientador – UFGD/FCA

Prof. Dr. Munir Mauad
UFGD/FCA

Drª. Maria Izabel Kruger Giurizatto
IAGRO

Dr. Guilherme Lafourcade Asmus
EMBRAPA/CPAO

A Deus, por sempre iluminar meu caminho

OFEREÇO

Aos meus amados pais, Lorival e Elisabete, por serem meus exemplos de vida... pela luta, compreensão, conselhos e por não medirem esforços para realização deste sonho

Às minhas irmãs, Larissa e Camila, pelo apoio e incentivo

A minha esposa Lenita, pelo amor e carinho e pela incondicional colaboração e dedicação na condução desta tese e compreensão pelos momentos dispensados em realizá-la

A minha filha Livia, luz da minha vida

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A professora Lilian Bacchi, pelo acompanhamento e colaboração de minha formação acadêmica. Pela confiança na condução das pesquisas e pela orientação importante na realização deste trabalho.

Ao professor Walber Gavassoni, pelas orientações e ensinamentos. Pela dedicação e empolgação na qual exerce seu trabalho, sendo um exemplo que tento seguir.

Ao professor Luiz Carlos Ferreira pela orientação e acompanhamento na pesquisa e colaboração na obtenção das sementes das culturas estudadas.

Aos amigos Anderson Bergamin, Fábio Régis, Bruno Pontim, Grazieli Reis e Lucia Hirata, os quais compartilhei momentos bons e ruins e que me ajudaram e se dispuseram a colaborar na realização deste trabalho, seja nas atividades desenvolvidas ou nas ideias e sugestões no decorrer da pesquisa.

Ao pesquisador e amigo Marco Rangel, que acreditou e me incentivou a seguir carreira acadêmica.

Aos companheiros de pós-graduação com os quais vivenciei momentos de descontrações nas festas da pós.

Aos alunos de graduação, Daniel Espindola e João Eugênio que colaboraram nas atividades e no desenvolvimento deste trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida.

Pelos valiosos ensinamentos recebidos dos professores do programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Grande Dourados.

A Universidade Federal da Grande Dourados pela oportunidade de realização desta pesquisa.

A Lucia, secretária do Programa de Pós-Graduação.

Um dia tentaram-me dizer que seria impossível realizar este sonho...

Hoje, posso responder...

"Mas pra quem tem pensamento forte, o impossível é só questão de opinião"
(Chorão / Thiago Castanho)

SUMÁRIO

PÁGINA
RESUMO..... viii
ABSTRACT..... ix
INTRODUÇÃO GERAL..... 1
CAPÍTULO I - REAÇÃO DE ESPÉCIES OLEAGINOSAS A *Sclerotinia sclerotiorum*..... 4
RESUMO..... 4
1.1 INTRODUÇÃO..... 6
1.2 MATERIAL E MÉTODOS..... 8
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 12
1.4 CONCLUSÕES..... 25
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 26
CAPÍTULO II - INOCULAÇÃO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM SEMENTES DE OLEAGINOSAS: TRANSMISSÃO E SEUS EFEITOS SOBRE A EMERGÊNCIA DE PLANTAS..... 29
RESUMO..... 29
2.1 INTRODUÇÃO..... 31
2.2 MATERIAL E MÉTODOS..... 33
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 35
2.4 CONCLUSÕES..... 40
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 41
CAPÍTULO III - RELAÇÃO ENTRE MASSA E LOCALIZAÇÃO DO ESCLERÓDIO NO SOLO COM A GERMINAÇÃO CARPOGÊNICA DE *Sclerotinia sclerotiorum*..... 43
RESUMO..... 43
3.1 INTRODUÇÃO..... 45
3.2 MATERIAL E MÉTODOS..... 47
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 49
3.4 CONCLUSÕES..... 54
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 55
CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 58

IMPLICAÇÕES DA INOCULAÇÃO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM CULTURAS BIOENERGÉTICAS

RESUMO: O trabalho teve por objetivo avaliar a reação de espécies oleaginosas à inoculação com *S. sclerotiorum*; verificar a taxa de transmissão planta-semente do patógeno e sua transmissibilidade por sementes, inoculadas artificialmente, e implicações na emergência de plântulas; e analisar os efeitos da massa e localização dos escleródios no solo em relação a germinação carpogênica dos escleródios. Os experimentos foram conduzidos na Universidade Federal da Grande Dourados. Para avaliação da patogenicidade do fungo, plantas de canola (*Brassica napus* var. *oleifera*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), crambe (*Crambe abyssinica*), girassol (*Helianthus annus*), nabo forrageiro (*Raphanus sativus* var. *oleiferus*) e níger (*Guizotia abyssinica*) foram semeadas em vasos, contendo 4,4 dm^3 de solo do tipo Latossolo Vermelho Distroférrico, por dois anos, em casa de vegetação. Procedeu-se a inoculação por meio do método do palito e discos de micélio fúngico, aos trinta dias após a semeadura. A severidade foi avaliada a cada dois dias, até a estabilização das notas. A transmissão semente-planta foi quantificada pela alocação de 50 sementes das referidas culturas em placas de Petri colonizadas por *S. sclerotiorum*, por 20 horas. As sementes foram semeadas em bandejas contendo 8,5 dm^3 de solo e a comprovação da transmissão foi realizada aos quinze dias após a semeadura, em meio Neon. A massa dos escleródios foi analisada por meio de seis classes: (C1) escleródios com massa inferior a 0,01g, (C2) 0,01<0,02g, (C3) 0,02<0,03g, (C4) 0,03<0,04g, (C5) 0,04<0,05g e (C6) 0,05<0,06g, alocando-os na superfície do solo e enterrados a 3 cm de profundidade, para mensuração da germinação carpogênica. Constatou-se que o fungo pode infectar todas as culturas estudadas, sendo a maior suscetibilidade observada em girassol, seguida de cártamo e crambe. Plantas de nabo forrageiro e canola apresentaram mecanismos de resistência em resposta à inoculação, com a vantagem de não sofrerem significativas reduções no rendimento das culturas. Não se verificou elevados danos em níger, porém, o fato mais importante foi a ausência da formação de escleródios nas plantas infectadas. Destaca-se a transmissão planta-semente do patógeno às sementes de crambe e a transmissão via sementes inoculadas às plântulas das culturas de canola, cártamo, crambe, girassol, nabo forrageiro e níger. Verificou-se ainda que escleródios com massa superior a 0,03g e localizados na superfície do solo apresentaram maior percentual de germinação carpogênica, número de estipes e apotécios por escleródio.

Termos para indexação: germinação carpogênica, espécies oleaginosas, taxa de transmissão

IMPLICATIONS OF THE INOCULATION OF *Sclerotinia sclerotiorum* IN BIOENERGY CROPS

ABSTRACT: This study aimed to evaluate the reaction of oilseed species to inoculation with *S. sclerotiorum*, ascertain the transmission rate of the pathogen plant-seed and transmissibility by artificially inoculated seed, and its implications on the emergence, and analyze the effects of the mass and location of sclerotia in the soil over carpogenic germination of them. The experiments were conducted at the Universidade Federal da Grande Dourados. To evaluate the pathogenicity of the fungus, plants of rapeseed (*Brassica napus* var. *oleifera*), safflower (*Carthamus tinctorius*), crambe (*Crambe abyssinica*), sunflower (*Helianthus annus*), oilseed radish (*Raphanus sativus* var. *oleiferus*) and niger (*Guizotia abyssinica*) were seeded in pots containing 4.4 dm^3 of soil type Rhodic Acrustox for two years in a greenhouse. The plants has been inoculated by the toothpick method and fungal mycelium discs, thirty days after sowing. The severity was assessed every two days, until stabilization of the disease. The seed-plant transmission was quantified by allocating 50 seeds of these cultures in Petri dishes colonized by *S. sclerotiorum* for 20 hours. The seeds were sown in trays containing 8.5 dm^3 of soil and evidence of transmission was held on the fifteenth day after sowing, in Neon culture medium. Sclerotia weight was analyzed by means of six classes: (C1) sclerotia with mass less than 0.01 g, (C2) from 0.01<0.02 g, (C3) from 0.02<0.03 g (C4) 0.03<0.04g, (C5) 0.04<0.05 g and (C6) 0.05<0.06 g, allocating them on the soil surface and buried 3 cm deep to measure carpogenic germination. It was found that the fungus can infect all cultures studied, and the greatest susceptibility observed in sunflower, safflower and then crambe. Plants of oilseed radish and rapeseed showed resistance mechanisms in response to inoculation with the advantage of not suffering significant reductions in crop yields. There was no damage in niger, but the most important fact was the absence of the formation of sclerotia on the infected plants. We highlight the plant-seed pathogen transmission of crambe seeds and inoculated seed transmission to seedlings crops rapeseed, safflower, crambe, sunflower, radish and niger. It was also found that sclerotia with mass greater than 0.03 g and located on the surface of the soil had a higher carpogenic germination percentage, number of stipes and apothecia by sclerotia.

Index terms: carpogenic germination, oil crops, transmission rate

INTRODUÇÃO GERAL

A crescente preocupação em relação ao meio ambiente e a rápida diminuição das reservas de combustíveis fósseis no mundo, além do aumento no preço do petróleo, resultaram em uma nova orientação da agricultura no sentido de buscar matérias primas para a produção de combustíveis alternativos. A produção de combustíveis a partir da agricultura constitui uma estratégia, que vem despontando no cenário mundial, como uma possibilidade de amenizar a crise de abastecimento de combustíveis. Nesse sentido, os biocombustíveis oferecem uma opção de fornecimento energético que permitiria contornar a escassez de petróleo e derivados, abrindo espaço para a continuidade do desenvolvimento econômico e gerando uma grande oportunidade para promover mudanças no agronegócio brasileiro (PLÁ, 2006).

O potencial brasileiro para a produção de biocombustíveis, que inclui o cultivo de oleaginosas e de cana-de-açúcar, é grande, pois o país possui mais de 90 milhões de hectares de terras que podem ser incorporados ao processo produtivo de maneira sustentável (PERES et al., 2005), e apresenta vantagens naturais para a agricultura energética como elevada insolação e boa distribuição de chuvas, além de outros fatores como vias de comunicação bem desenvolvidas, a mão de obra qualificada e uma maquinaria moderna e bem desenvolvida (PLÁ, 2006).

É incontestável a necessidade de se buscar novas fontes de energia renovável, destacando como grande alternativa a energia proveniente da biomassa. Entretanto, a sustentabilidade do programa de biocombustíveis é dependente de práticas conservacionistas racionais, como a utilização de rotações agrícolas adequadas e do sistema plantio direto.

O Brasil ocupa uma posição de destaque na produção e exportação de óleo de soja, mostrando seu grande potencial para se tornar produtor e consumidor de biodiesel a partir deste óleo. Pode-se ainda citar, a oportunidade de utilização de diferentes espécies de oleaginosas para a produção de biodiesel devido à grande variedade encontrada nas diversas regiões do país, dentre elas destacam-se para a região central do país, culturas anuais como crambe (*Crambe abssynica* Hoechst) (OPLINGER et al., 1991), canola (*Brassica napus* L. var. *oleifera*), girassol (*Helianthus annuus* L.) (VARGAS et al., 1998), cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) (VIVAS, 2002), nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L. var. *oleiferus* Metzg.) (PLÁ, 2006) e níger (*Guizotia abyssinica* L.) (SARIN et al., 2009).

A disponibilidade de opções para a escolha das oleaginosas que serão cultivadas deverá garantir a estabilidade no fornecimento de matérias primas para a produção de

combustíveis no futuro. É possível pensar em rotações de culturas que incluam mais de uma oleaginosa, já que existem oleaginosas pertencentes a famílias botânicas diferentes, possibilitando a alternância de culturas de famílias diversas, de forma a quebrar o ciclo de vida dos micro-organismos patogênicos e fazer um melhor aproveitamento do solo (PLÁ, 2006).

Dentre os micro-organismos fitopatogênicos, destaque deve ser dado ao fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, agente causal da doença conhecida como mofo branco, porém, conforme o hospedeiro pode receber diferentes denominações, entre elas: podridão de sclerotinia, podridão da cabeça ou capítulo, podridão aquosa ou mole e podridão da haste.

Sclerotinia sclerotiorum é considerado um dos patógenos mais importantes no mundo e está distribuído em todas as regiões produtoras, sejam elas temperadas, subtropicais ou tropicais (LEITE, 2005), mais comumente em regiões temperadas (PERVEEN et al., 2010). O fungo pertence a um grupo de patógenos de solo que ataca agressivamente o hospedeiro, mas não apresenta especificidade e por isso possui ampla gama de hospedeiros, os quais incluem plantas ornamentais, hortícolas, culturas comerciais, frutíferas e florestais (BEDENDO, 1995), causando infecções que podem ser iniciadas em raizes, hastes, axila das folhas, inflorescências, pétalas de flores em senescência, vagens e capítulos.

No Brasil, essa doença foi relatada pela primeira vez em 1921, no Estado de São Paulo, em plantas de batata (MEYER, 2011). Atualmente, encontra-se disseminada em todas as regiões do país, sendo a ocorrência maior nos estados do Sul, Sudeste e Centro-Oeste. O patógeno causa grandes perdas em importantes culturas como soja, feijão, girassol e canola (BOLAND e HALL, 1994), notadamente em locais com alta umidade no solo e temperaturas amenas.

O uso de sementes infectadas com micélio e/ou infestadas com escleródios é, provavelmente, a principal causa da introdução desse patógeno em novas áreas de cultivo. A presença do patógeno nas sementes resulta em podridões de pré e pós-emergência e tombamento de plântulas. Nos tecidos infectados o patógeno produz estruturas de resistência, os escleródios, que na ausência da planta hospedeira, podem permanecer no solo por longos períodos. Os escleródios apresentam formato irregular e tamanho variado. De acordo com Bolton et al. (2006) escleródios formados em girassol ocupam todo o interior da semente, podendo chegar a 3,5 cm de diâmetro, enquanto àqueles produzidos no feijão são globosos e medem entre 2 a 10 milímetros de diâmetro. Uma vez introduzidos em uma área cultivada, este fungo constitui um problema de difícil controle (BUENO et al., 2007) e custo

relativamente elevado, visto que a severidade da doença é proporcional à densidade de inóculo de seu agente causal.

Em condições favoráveis e na presença de um hospedeiro suscetível, o escleródio germina e pode produzir micélio, que penetra diretamente nos tecidos da base da planta, ou formar apotécios, que emergem na superfície do solo e liberam os ascósporos. Em condições de alta umidade relativa, acima de 70%, e temperatura ao redor de 20ºC, os apotécios liberam ascósporos durante várias semanas, que são responsáveis pela infecção da parte aérea das plantas (LEITE, 2005). Entretanto, este fungo requer condições bastante particulares, com temperaturas relativamente baixas e umidade para atingir nível de dano econômico (TOMM, 2006), o que torna a resposta do hospedeiro altamente dependente do ambiente. Por outro lado, estudos também têm mostrado que existem diferenças entre isolados do patógeno quanto à sua virulência. Pratt e Rowe (1991) relataram diferenças na resistência de genótipos de alfafa quando inoculadas com o patógeno, assim como Peres e Regnaultt (1993), em trabalho com girassol, que verificaram diferenças na virulência entre isolados desse fungo por meio da inoculação de raízes por escleródios.

Visando gerar informações para embasar a escolha de culturas com potencial energético para a região, assim como a relação de *S. sclerotiorum* com a severidade dos danos ocasionados nas plantas, a transmissão via sementes e o potencial infectivo dos escleródios, pretende-se: avaliar a reação de espécies oleaginosas como crambe, canola, cártamo, girassol, nabo forrageiro e níger à inoculação com *S. sclerotiorum*; verificar a taxa de transmissão do patógeno da planta mãe às suas sementes e a transmissibilidade de *S. sclerotiorum* de sementes, das referidas oleaginosas, inoculadas artificialmente, e suas implicações na emergência de plântulas; e analisar os efeitos na diferença da massa e localização dos escleródios no solo e relação com a germinação carpogênica dos escleródios.

CAPÍTULO I

REAÇÃO DE ESPÉCIES OLEAGINOSAS A *Sclerotinia sclerotiorum*

RESUMO: Foram conduzidos dois ensaios experimentais com o objetivo de avaliar a reação de oleaginosas à inoculação com *S. sclerotiorum*, relacionando a severidade da doença com as alterações nos componentes fisiológicos e de produção das culturas, assim como verificar a taxa de transmissão planta-semente do patógeno. No primeiro ensaio, plantas de canola (*Brassica napus* var. *oleifera*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), crambe (*Crambe abyssinica*), girassol (*Helianthus annus*) e nabo forrageiro (*Raphanus sativus* var. *oleiferus*) foram inoculadas com o fungo, pelo método do palito. No segundo, acrescentou-se às espécies, a cultura do níger (*Guizotia abyssinica*), sendo adotada como metodologia de inoculação, discos de micélio fúngico. A semeadura das culturas foi realizada em vasos plásticos, contendo 4,4 dm^3 de solo do tipo Latossolo Vermelho Distroférrico, deixando-se duas plantas por vaso. As plantas foram inoculadas aos trinta dias após a semeadura, sendo mantidas em câmara úmida por um período de 36 horas. As avaliações da severidade da doença iniciaram-se por ocasião da retirada da câmara e a partir de então a cada dois dias, até a estabilização das notas. Observou-se que *S. sclerotiorum* apresenta patogenicidade a todas as culturas estudadas, sendo as maiores severidades e consequentemente os danos, constatados em girassol, seguido por cártamo e crambe. Foi verificado que as plantas de nabo forrageiro e canola apresentaram mecanismos de defesa em resposta à inoculação com o fungo, sendo observado um processo de cicatrização no local da inoculação, todavia, maior resistência ao patógeno foi verificada nas plantas de nabo forrageiro. Constatou-se transmissão de *S. sclerotiorum* apenas, no primeiro ensaio, às sementes de crambe.

Termos para indexação: mofo branco, resistência à doença, transmissão planta-semente

REACTION OF OIL SPECIES TO *Sclerotinia sclerotiorum*

ABSTRACT: Two experiments were conducted to evaluate the reaction of oilseed plants to inoculation with *S. sclerotiorum*, correlating the disease severity with the physiological components changes and crop production, as well as checking the plant-seed transmission rate of the pathogen. In the first experiment, plants of rapessed (*Brassica napus* var. *oleifera*), safflower (*Carthamus tinctorius*), crambe (*Crambe abyssinica*), sunflower (*Helianthus annus*) and oilseed radish (*Raphanus sativus* var. *oleiferus*) were inoculated with the fungus, by toothpick method. In the second, added to the species, niger (*Guizotia abyssinica*) was cultivated, and inoculation was done with discs of fungal mycelium. The sowing of crops was conducted in plastic pots containing 4.4 dm^3 of soil type Rhodic Acrustox, leaving two plants per pot. Plants were inoculated at thirty days after sowing, and kept in a moist chamber for a period of 36 hours. Assessments of disease severity were initiated after the withdrawal of the chamber and thereafter every two days, until stabilization of disease severity. It was observed that *S. sclerotiorum* pathogenicity presents to all cultures, the greatest severity and consequently the damage were observed in sunflower, followed by safflower and crambe. It was found that plants of oilseed radish and rapeseed showed defense mechanisms in response to inoculation with the fungus, being observed a healing process at the site of inoculation, however, resistance to the pathogen was detected in wild radish plants. It was found transmission of *S. sclerotiorum* to crambe seed only in the first test.

Index terms: white mold, disease resistance, plant-seed transmission

1.1 INTRODUÇÃO

A utilização dos óleos vegetais no Brasil tem um futuro promissor, uma vez que o país é um dos maiores produtores mundiais de soja e possui grandes perspectivas para a produção de outras oleaginosas anuais, principalmente àquelas semeadas na safra de inverno como a canola, girassol, cártamo, crambe, nabo forrageiro e níger. A diversidade de espécies é importante para reduzir a capacidade ociosa das indústrias de esmagamento e de extração, que desta forma passam a processar a partir de uma maior diversidade de matéria prima (SILVA e FREITAS, 2008).

Tem-se relato, em muitas culturas com potencial bioenergético, sintomas da doença conhecida como mofo branco, ocasionada pelo fungo *S. sclerotiorum* (BRADLEY et al., 2003; YANG et al., 2007; REIMONTE e CASTAÑO 2008). O fungo infecta mais de 500 espécies com origens filogenéticas diversas, incluindo grandes culturas, fruteiras, ornamentais e ervas daninhas (SAHARAN e MEHTA, 2008), nas quais apresenta potencial para causar sérias perdas no rendimento (LU, 2003) tornando-se assim, um dos mais bem sucedidos e devastadores patógenos fúngicos (BOLAND e HALL, 1994).

Apesar das inúmeras espécies de plantas atacadas e a aparente incapacidade das culturas resistirem a este patógeno, salienta-se que as interações de plantas com fungos fitopatogênicos são extremamente complexas, onde plantas tentam resistir ao ataque dos patógenos aliando mecanismos estruturais e/ou bioquímicos, sejam eles pré ou pós-formados, enquanto fungos além de agir diretamente sobre o tecido vegetal, podem também produzir enzimas que metabolizam e detoxificam as defesas do hospedeiro.

A penetração de *S. sclerotiorum* nas plantas pode ocorrer através dos estômatos ou diretamente na cutícula, por meio de enzimas e/ou força mecânica (GUIMARÃES e STOTZ, 2004). Após o contato com o hospedeiro, o fungo secreta fatores de patogenicidade múltiplos que incluem o ácido oxálico e um grande arsenal de enzimas líticas (COTTON et al., 2003). Por outro lado, a planta reconhece o micro-organismo e ocorre o desencadeamento de respostas celulares. O processo inicia-se quando um elicitor se liga a um possível receptor na superfície da célula vegetal e por meio dele o sinal é transmitido para o interior da célula, ativando os mensageiros secundários, que o amplificam e regulam a expressão de genes específicos, sendo determinante no desenvolvimento de interações compatíveis (doença) ou incompatíveis (resistência) (LEITE et al., 1997).

As respostas de diferentes germoplasmas à *S. sclerotiorum* têm sido afetadas pela variação na virulência dos isolados (CARPENTER et al., 1999), pelas condições ambientais

(ROUSSEAU et al., 2004) e métodos de inoculação (AUCLAIR et al., 2004). Embora resistência completa não tenha sido identificada, a resistência parcial em cultivares de soja (DIERS et al., 2006) e girassol (PELUFFO et al., 2010) podem elucidar novos caminhos na luta contra este patógeno.

Embora vários estudos tenham demonstrado a redução no rendimento de algumas culturas pela incidência de mofo branco, poucos, relacionaram a severidade da doença com os componentes fisiológicos e de produção de espécies oleaginosas. Diante do exposto, o trabalho teve por objetivo avaliar a reação de oleaginosas como crambe, canola, cártamo, girassol, nabo forrageiro e níger à inoculação com *S. sclerotiorum*, relacionando a severidade da doença com as alterações nos componentes fisiológicos e de produção das culturas, assim como verificar a taxa de transmissão do patógeno da planta mãe às suas sementes.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi composto de dois ensaios experimentais. Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia e em casa de vegetação na Universidade Federal da Grande Dourados. No primeiro ensaio, implantado em 16 de abril de 2009, plantas de canola, cultivar Hyola 61 (*Brassica napus* var oleífera), cártamo (*Carthamus tinctorius*), crambe, cultivar FMS Brilhante (*Crambe abyssinica*), girassol, cultivar M 734 (*Helianthus annus*) e nabo forrageiro, cultivar AL 1000 (*Raphanus sativus* var. *oleiferus*) foram inoculadas com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, por meio do método do palito.

Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e dez repetições no primeiro ensaio e seis tratamentos e nove repetições no segundo ensaio. Para análise dos caracteres fisiológicos foi comparado o desempenho das plantas inoculadas àquelas não inoculadas, sendo os tratamentos arranjados em um fatorial 5 x 2, com 10 repetições no primeiro ensaio, enquanto no segundo, um fatorial 6 x 2 com 9 repetições.

O solo utilizado foi o Latossolo Vermelho Distroférrico, corrigido com calcário dolomítico, visando obter uma saturação por bases de 60%. A semeadura das culturas foi realizada em vasos plásticos, contendo 4,4 dm^3 de solo, adubado na base com 0,34 $g.dm^{-3}$ de P_2O_5, 0,09 $g.dm^{-3}$ de K_2O e 0,04 $g.dm^{-3}$ de N e 0,6 $mg.dm^{-3}$ de B, e em cobertura, 30 dias depois, com 0,03 $g.dm^{-3}$ de K_2O, 2,0 $mg.dm^{-3}$ de Zn, 1,8 $mg.dm^{-3}$ de Mn, 0,8 $mg.dm^{-3}$ de Fe, 0,7 $mg.dm^{-3}$ de Cu, 0,4 $mg.dm^{-3}$ de B e 0,1 $mg.dm^{-3}$ de Mo.

Foi semeado 10 sementes por vaso, no qual, dez dias após a emergência procedeu-se o desbaste, deixando-se duas plantas por vaso. Os vasos foram irrigados, mantendo-se um turno de rega de dois dias, de modo a manter a umidade do solo em 60% da capacidade de campo.

As plantas foram inoculadas aos trinta dias após a semeadura, por meio do método do palito (GASPERI, 2000). Nesse método, para o preparo do inóculo, palitos de dente com 15 mm de comprimento foram autoclavados e acondicionados em posição vertical em placas de Petri contendo meio BDA, ainda não solidificado, juntamente com antibiótico (tetraciclina 250 mg/L), em quantidade suficiente para que cerca de 3 mm da ponta dos palitos permanecessem acima do meio de cultura. Posteriormente foram distribuídos nas placas, três escleródios, de forma equidistante, do isolado de *S. sclerotiorum*, obtido em lavoura de soja, e incubados em câmara BOD durante sete dias a 20ºC (±2ºC) e fotoperíodo de 12 horas, para promover a colonização dos palitos pelo fungo. Por ocasião da inoculação, os palitos ficaram com suas extremidades totalmente colonizadas pelo patógeno. Depois do período de

incubação, os palitos foram inseridos nas hastes, acima das folhas primárias das plantas (Figura 1). Nas parcelas testemunhas a perfuração da haste foi realizada apenas com palitos esterilizados.

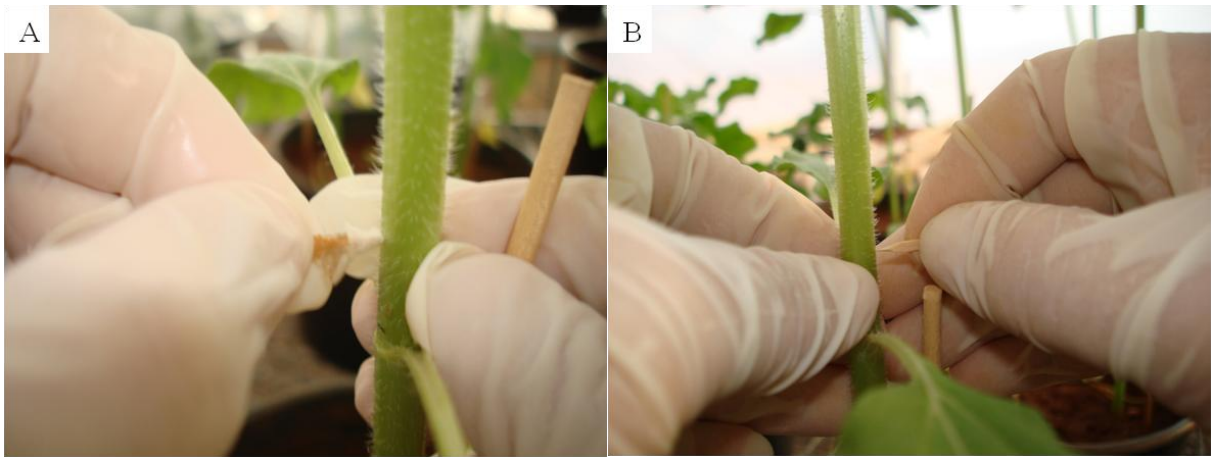

FIGURA 1. Inoculação de plantas utilizando-se o método do palito. (A) com micélio fúngico; (B) tratamento testemunha.

No segundo ensaio, implantado em 27 de abril de 2010, acrescentou-se às espécies com potencial para produção de biodiesel citadas anteriormente, a cultura do níger (*Guizotia abyssinica*) e utilizou-se o material de girassol EMBRAPA 122, sendo adotada como metodologia de inoculação, discos de micélio fúngico.

Efetuou-se nessa metodologia a alocação dos escleródios no centro de placas de Petri contendo meio de cultura BDA, juntamente com antibiótico. Em seguida as placas foram incubadas em câmara BOD por sete dias a 20ºC (±2ºC) e fotoperíodo de 12 horas, para promover a colonização do meio de cultura pelo patógeno. Discos de 5 mm de diâmetro contendo micélio fúngico foram retirados a partir das margens crescentes da colônia e inoculados na axila das folhas primárias das plantas de forma invertida, ou seja, a superfície que continha o micélio foi colocada em contato com a planta (Figura 2). Para as plantas do tratamento controle, utilizaram-se discos de BDA sem micélio fúngico. Procedeu-se a inoculação aos trinta dias após a semeadura.

As plantas inoculadas, em ambos os ensaios, foram cobertas com um saco plástico transparente, preso ao vaso com um barbante de modo a formar uma câmara úmida, na qual permaneceram por um período de 36 horas. Iniciaram-se as avaliações da severidade da doença por ocasião da retirada da câmara e a partir de então a cada dois dias, até a estabilização das notas. A severidade foi analisada com base na escala de 0 a 7, em que: 0 = ausência de sintomas; 1 = início do desenvolvimento de uma lesão circular; 2 = lesão de até

1,0 cm de comprimento; 3 = lesão entre 1,1 e 2,0 cm; 4 = lesão entre 2,1 a 5,0 cm; 5 = lesão maior que 5,0 cm; 6 = planta morta; 7 = aparecimento de escleródio.

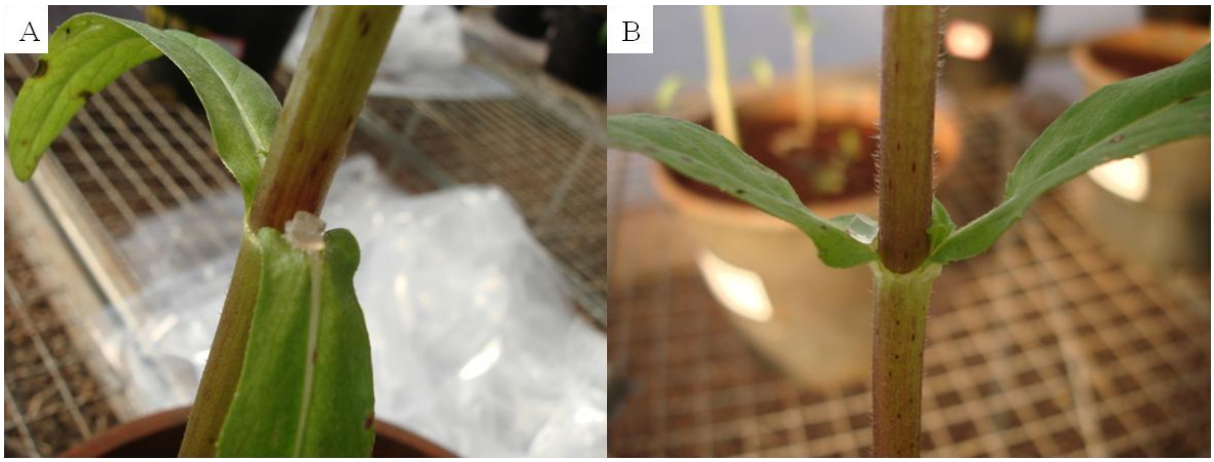

FIGURA 2. Inoculação de plantas utilizando-se discos de micélio. (A) com micélio fúngico; (B) tratamento testemunha.

Em relação à doença analisaram-se o índice de doença (ID = Σ(grau da escala x frequência) x 100/(nº total de unidades x grau máximo da escala)), área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) calculada a partir da severidade média da doença nas plantas (CAMPBELL e MADDEN, 1990), tempo para formação da lesão (dias), tamanho de lesão (cm), AACPD calculada a partir do comprimento médio das lesões, tempo para o aparecimento dos escleródios (dias), número e massa de escleródios formados (g). Para os caracteres fisiológicos foram quantificados a taxa de crescimento aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação ($cm.dia^{-1}$) (TC = $altura_{n+1}$ - $altura_n$/período da medição), índice relativo de clorofila, mensurado com auxílio do clorofilômetro Minolta modelo SPAD-502 (Soil Plant Analysis Development) por ocasião do florescimento pleno, altura no florescimento e na colheita (cm), massa seca da parte aérea e raiz (g). Para quantificação da massa seca, o material foi acondicionado em estufa com circulação forçada de ar a uma temperatura de 55ºC até a obtenção de massa constante. Foi mensurado ainda os componentes do rendimento: número de síliqua/capítulo por planta, número de sementes por síliqua/capítulo, massa de cem grãos (g) e o rendimento, contabilizado em $g.planta^{-1}$ com o percentual de 13% de umidade.

As sementes provenientes das parcelas que receberam a inoculação com o fungo foram submetidas à avaliação para determinar a taxa de transmissão do patógeno da planta às suas sementes, conforme metodologia do “blotter test” (NEERGAARD, 1979). As sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% por um minuto, enxaguadas em água destilada, e secas ao ar por 12 horas. As sementes foram distribuídas em gerbox, contendo três

folhas de papel filtro, pré-umedecidas em solução do herbicida 2,4-D a 0,01%. Posteriormente, as mesmas foram incubadas à temperatura de 15ºC em escuro contínuo, durante quinze dias (KOCH e MENTEN, 2000). A detecção de *S. sclerotiorum* foi realizada examinando-se individualmente as sementes, após o referido período de incubação.

Os dados, relacionados à doença foram transformados em $\sqrt{x} + 1$, submetidos à análise de variância com auxílio do programa SISVAR e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Para as características fisiológicas fixou-se o fator culturas, analisando-se apenas o efeito da inoculação para cada espécie. Foi realizado, também, análise de correlação linear entre os caracteres coletados.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as plantas inoculadas apresentaram sintomas e sinais típicos da doença causada por *Sclerotinia sclerotiorum*, com micélio branco abundante, visíveis nas hastes e algumas folhas. No entanto, a resposta das culturas a inoculação, seja no primeiro ensaio (1E) ou segundo ensaio experimental (2E), ocorreu de forma diferenciada, demonstrando efeito significativo para todas as características analisadas (Tabela 1).

TABELA 1. Tempo para formação de lesão (TFL), tamanho de lesão (TL), área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para lesão e severidade e índice de doença (ID) de espécies oleaginosas submetidas à inoculação com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.

1° Ensaio Experimental					
Culturas	TFL (dias)	TL (cm)	AACPD Lesão	ID (%)	AACPD Severidade
Girassol	2,0 b	17,20 a	555,1 a	97,1 a	221,8 a
Cártamo	2,4 b	5,17 b	157,8 b	93,6 a	196,7 a
Crambe	4,8 a	3,03 c	60,3 c	45,7 b	85,2 b
Canola	4,8 a	1,37 d	38,3 c	37,1 b	76,2 b
Nabo F.	4,1 a	0,73 d	19,9 c	25,7 b	55,3 b
CV (%)	2,25	2,43	8,65	6,05	7,04
2° Ensaio Experimental					
Culturas	TFL (dias)	TL (cm)	AACPD Lesão	ID (%)	AACPD Severidade
Girassol	6,9 a	15,11 a	312,5 a	61,6 a	102,1 a
Cártamo	4,0 b	3,74 b	59,6 b	29,4 b	60,4 b
Crambe	9,4 a	7,23 b	90,8 b	27,0 b	39,9 b
Níger	8,4 a	2,67 b	30,9 b	27,7 b	46,5 b
Canola	5,5 b	0,35 c	3,9 c	7,1 c	13,6 c
Nabo F.	6,0 b	0,0 c	0,0 c	0,9 c	1,9 c
CV (%)	1,58	4,88	16,87	9,70	11,93

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de agrupamento Scott-Knott a 5% de probabilidade.

No 1E observou-se rápida formação das lesões, sendo constatado em média, até o quinto dia após a instalação do ensaio, que todas as plantas apresentavam-se doentes. O

período de infecção e colonização foi menor para as culturas do girassol e cártamo, observando-se que algumas plantas de girassol apresentaram a haste quebrada no momento da retirada da câmara úmida (36 horas). No 2E as lesões ocorreram de forma mais tardia, sendo verificadas primeiramente em cártamo, canola e nabo forrageiro. Em inoculação de folhas de canola, Yang et al. (2007) relataram aparecimento de lesões necróticas após 12 horas, ao passo que em inoculação de hastes, seja pelo método do pecíolo ou discos de micélio, tem se verificado início dos sintomas em torno de três dias após a inoculação em soja (WEGULO et al., 1998), níger (BRADLEY et al., 2003) e canola (ZHAO et al., 2004). Para Garg et al. (2010a) tanto cultivares resistentes como suscetíveis apresentam suscetibilidade para serem infectadas em fase inicial, todavia, àquelas resistentes são capazes de promover o retardamento do desenvolvimento do patógeno, tanto sobre a superfície da planta como dentro dos tecidos do hospedeiro. Pela rapidez com que o patógeno infecta seu hospedeiro, antes que o mesmo possa expressar suas defesas (YANG et al., 2007), torna plausível considerar a velocidade de colonização como um importante fator de patogenicidade de *S. sclerotiorum*.

Para penetrar em seus hospedeiros, *S. sclerotiorum* secreta ácido oxálico e enzimas líticas (COTTON et al., 2003), que atuam de forma dinâmica no decorrer do processo patogênico. O ácido oxálico penetra no tecido ao redor da lesão, reduzindo e fornecendo pH ótimo para a ação de enzimas, que atuariam em conjunto com a finalidade de fragmentar e degradar a parede celular das plantas e os tecidos subjacentes, permitindo a penetração e desenvolvimento através do hospedeiro (GIRARD et al., 2004). Desta forma, utilizando-se a metodologia do palito, poderia se prever que a alocação do patógeno no interior da culturas desconsideraria, caso houvessem, os mecanismos de defesa pré-formadas e resultaria no desenvolvimento mais rápido das lesões, evidenciado pela presença de lesões após a retirada das plantas da câmara úmida.

Nos dois ensaios experimentais, as plantas de girassol apresentaram as maiores lesões, enquanto o menor tecido afetado pelo patógeno foi observado às culturas do nabo forrageiro e canola. Enfatiza-se que no 2E foi verificado apenas início de lesão em plantas de nabo forrageiro, porém, em valores não mensuráveis conforme escala de notas adotada. Garg et al. (2010b) verificaram que lesões em plantas de canola estenderam-se por 4 cm ao longo do caule, enquanto que em linhagens desenvolvidas a partir de brássicas selvagens, as lesões foram inferiores a 0,5 cm. Para os autores, comprimento de lesão menores que 1 cm confirmam a elevada resistência das plantas. Adotando-se esse parâmetro, pode-se relatar resistência das plantas de nabo forrageiro em ambos os ensaios experimentais e canola, apenas no 2E.

Tanto para nabo forrageiro como canola foi observado, inicialmente, lesões aquosas e com presença de micélio, todavia, as mesmas não progrediram e apresentaram uma reação semelhante a uma cicatrização. Garg et al. (2010a) relataram, aos oito dias após a inoculação, que em plantas de canola resistentes, a invasão do patógeno foi confinada à epiderme superior, enquanto que nas suscetíveis ficou evidente a colonização em todo o tecido foliar. Esse fato pode estar relacionado a grande variedade de fitoalexinas produzidas por espécies de *Brassica*, em resposta à infecção por *S. sclerotorium*, com capacidade de inibir o crescimento do patógeno (PEDRAS et al., 2007). No trabalho, foi observado crescimento micelial visível, próximo ao ponto de inoculação, sobre as plantas de canola. Após o contato do micélio fúngico com as folhas da planta, constatou-se a abscisão das referidas folhas, o que poderia estar relacionado a um mecanismo de ataque do patógeno ou mesmo de defesa das plantas de canola, o que seria mais provável. Esse fato não interferiu na ocorrência da doença no 1E, porém, no 2E, foi determinante pelo não estabelecimento do patógeno na maioria das plantas inoculadas.

Todas as plantas de girassol inoculadas apresentaram lesões nas hastes, as quais alcançaram 17,2 e 15,11 cm, no 1E e 2E, respectivamente. Salienta-se a velocidade com que as lesões progrediam no tecido da planta, proporcionando AACPD para lesão significativamente superiores às demais culturas. Resultados semelhantes foram encontrados por Reimonte e Castaño (2008). Os autores relataram ainda, diferenças entre as cultivares de girassol, em relação ao tamanho das lesões, que exibiram 6,9 cm para o grupo considerado resistente e 16,7 cm para àquelas suscetíveis.

Foi observado em todas as culturas, principalmente em girassol, que a lesão acima do local inoculado foi consideravelmente maior comparado ao crescimento verificado abaixo do ponto de inoculação (Figura 3). Esse dado sugere que a translocação do ácido oxálico, produzido pelo patógeno, seria no sentido ascendente, juntamente com o fluxo de água na planta. Guimarães e Stotz (2004) verificaram que o ácido oxálico induz o aumento na absorção de potássio como mecanismo para regular o turgor das células-guardas e favorecer a penetração do patógeno. Em trabalhos preliminares, foi constatada uma relação positiva entre o tamanho de lesão e a relação massa verde/massa seca das plantas, ou seja, quanto maior os teores de água no tecido vegetal, maiores eram as lesões provocadas pelo fungo, podendo-se inferir que o aumento no volume de água facilita a difusão do ácido oxálico nos tecidos das plantas. Outros autores também verificaram efeito anatômico das plantas sobre a doença. Em trabalho com plantas de canola, Zhao et al. (2004) relataram que a pequena distância dos nós da haste retardaram o avanço do patógeno, enquanto Wegulo et al. (1998), ao constatar

divergências nas medidas de descoloração das hastes, é mais enfático ao mencionar que o tecido lenhoso de hastes de soja reduz a difusão do ácido oxálico.

FIGURA 3. Progresso de mofo branco em plantas de girassol. (A) dois dias após a inoculação; (B) quatro dias após a inoculação.

Com a expansão da lesão observou-se o avanço da doença sobre os tecidos afetados, resultando na morte de plantas de girassol, cártamo e crambe. A velocidade com que *S. sclerotiorum* colonizou os tecidos de girassol e cártamo, aliado a grande quantidade de plantas mortas das culturas no 1E, proporcionaram valores significativamente superiores tanto para a AACPD para a severidade como também para o índice de doença. Avaliando a suscetibilidade de híbridos de girassol, Reimonte e Castaño (2008), também verificaram elevado percentual de severidade de mofo branco, relatando valores médios de 93% quantificado aos 60 dias após a inoculação. Não se registrou a morte de plantas de canola e nabo forrageiro, porém, ainda assim, as culturas não diferiram da cultura do crambe em relação ao índice de doença e AACPD para a severidade.

No 2E a doença não se desenvolveu de maneira uniforme, sendo constatados 50, 22,2 e 5,5% de plantas mortas para girassol, crambe e cártamo, respectivamente. Tem sido relatada significativa quantidade de compostos fenólicos, seja constitutivos ou induzidos, responsáveis pela resistência de genótipos de girassol a *S. sclerotiorum* (PRATS et al., 2007). Nos resultados observados no trabalho, notou-se índice de doença e AACPD para severidade

superiores para a cultura do girassol, supondo-se que a efetividade dos referidos compostos ocorra em outros locais da planta, como nos capítulos conforme citado no trabalho de Prats et al. (2003), ou mesmo porque o material utilizado na pesquisa seja suscetível. Destaca-se para ambas as características (ID e AACPD), as culturas de nabo forrageiro e canola que apresentaram valores significativamente inferiores às demais culturas estudadas. Expondo plantas de canola a 40 mM de ácido oxálico, Bradley et al. (2006), não observaram lesões, tampouco murcha, sugerindo uma possível tolerância das plantas ao ácido.

Com a sequência do processo infeccioso, têm-se a morte da célula do hospedeiro e este processo é então desviado para as necessidades nutricionais do fungo (DICKMAN, 2007). Posteriormente à extração dos compostos essenciais, inicia-se o desenvolvimento dos escleródios. No 1E, verificou-se nas plantas de girassol o menor intervalo de tempo entre a inoculação das plantas e o aparecimento dos escleródios, onde em apenas oito dias, constatou-se a presença das estruturas de resistência (Tabela 2). No 2E os primeiros escleródios também foram observados nas plantas de girassol, sem, contudo, apresentar diferença para o período com que as estruturas se desenvolveram em crambe.

TABELA 2. Tempo para o aparecimento dos escleródios (TAE), número (NE) e massa por escleródio (ME) em plantas oleaginosas submetidas à inoculação com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.

	1º Ensaio Experimental			2º Ensaio Experimental		
Culturas	TAE (dias)	NE (nº)	ME (g)	TAE (dias)	NE (nº)	ME (g)
Girassol	8,2 d	23,7 a	0,0363 a	19,5 b	15,5 a	0,0206 a
Cártamo	13,1 c	10,1 b	0,0077 b	26,0 a	2,3 b	0,0171 b
Crambe	25,0 a	10,3 b	0,0077 b	22,0 b	3,1 b	0,0083 c
Canola	19,0 b	3,3 c	0,0055 b	-	0,0 c	0,0 d
Nabo F.	-	0,0 d	0,0 b	-	0,0 c	0,0 d
Níger				-	0,0 c	0,0 d
CV (%)	9,04	15,74	4,06	10,35	5,13	0,13

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Foi observada correlação positiva entre o NE e o TL e AACPD para lesão, em valores de 0,97 e 0,95 no 1E e 0,97 e 0,99 no 2E, respectivamente. Em ambos os ensaios experimentais constatou-se maior quantidade de escleródios em plantas de girassol, enquanto cártamo e crambe apresentaram valores que não diferiram entre si.

Salienta-se que não ocorreu desenvolvimento de escleródio nas hastes de plantas de canola no 1E, sendo que os valores registrados na Tabela 2 foram oriundos das folhas caídas após o contato com micélio fúngico. Diferente dos resultados encontrados por Zhao et al. (2004), que relataram a formação de escleródios em hastes de cultivares de canola suscetíveis. Uma observação interessante realizada no trabalho foi a constatação de germinação carpogênica dos escleródios produzidos nas folhas de canola sobre a superfície do solo, que aliado às condições favoráveis ao patógeno, formaram apotécios e os ascósporos, ao serem liberados, infectaram todas as plantas de girassol, inicialmente não inoculadas, provocando sua morte. Mofo branco é uma doença monocíclica, o que torna incomum a produção de escleródio, germinação carpogênica e consequente infecção das plantas em uma mesma estação de cultivo. Por duas oportunidades em lavouras de soja, Mueller et al. (1999), observaram germinação carpogênica de escleródios produzidos na mesma safra, porém, nenhuma planta foi infectada.

No 1E verificou-se elevada diferença entre a massa de escleródios produzidos nas plantas de girassol quando comparado a cártamo, crambe e canola, que apresentaram escleródios com massa inferior a 0,01g, considerado de menor potencial infectivo (Capítulo III). No 2E, os escleródios formados em girassol também apresentaram massa significativamente superior aos encontrados em cártamo e crambe, todavia, apenas em crambe se desenvolveu escleródios com massa inferior a 0,01g.

Para as plantas de níger, ao contrário dos resultados de Bradley et al. (2003), não se constatou a formação de escleródios, mesmo as plantas apresentando lesões de 2,67 cm em média e 27,7% de índice de doença. Visualmente, o desenvolvimento do patógeno e os consequentes danos às plantas de níger foram semelhantes aos observados para cártamo e crambe, todavia, nesta cultura não ocorreu formação de escleródio. Esse fato demonstra a necessidade de maiores investigações a cerca do assunto, afinal, uma cultura que não multiplique um patógeno tão agressivo quanto *S. sclerotiorum*, seria uma alternativa extremamente interessante para compor esquemas de rotação de culturas, de modo a não aumentar a fonte de inóculo do patógeno no solo.

A taxa de crescimento das plantas (TC) verificada no 1E demonstrou ser um importante e rápido indicativo da interferência do patógeno sobre o crescimento das culturas. Logo na primeira coleta de dados, aos 7 dias após a inoculação (DAI), constatou-se que as plantas de canola, crambe, cártamo e girassol apresentaram significativa redução na TC, em valores de 41,7, 61,5, 82,8 e 83,8%, respectivamente. Mesmo em plantas de nabo forrageiro, apesar da ausência de diferença na análise, observou-se 46,2% de redução aos 7 DAI, como se

a planta desviasse seus recursos metabólicos para a defesa contra *S. sclerotiorum*, em detrimento de seu crescimento (Tabela 3).

TABELA 3. Taxa de crescimento de culturas oleaginosas submetidas e não a inoculação com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.

1° Ensaio Experimental					
Inoculação	Culturas				
	Canola	Cártamo	Crambe	Girassol	Nabo F.
7 dias após a inoculação					
Não inoculadas	1,39 a	2,04 a	0,91 a	2,59 a	0,78 a
Inoculadas	0,81 b	0,35 b	0,35 b	0,42 b	0,42 a
CV	12,21%				
14 dias após a inoculação					
Não inoculadas	0,49 a	1,06 b	1,47 a	1,35 a	0,36 a
Inoculadas	0,56 a	1,36 a	1,07 b	1,43 a	0,28 a
CV	8,10%				
21 dias após a inoculação					
Não inoculadas	0,18 a	0,88 a	1,57 a	0,87 a	0,17 a
Inoculadas	0,28 a	0,39 b	0,92 b	0,57 b	0,14 a
CV	9,24%				
28 dias após a inoculação					
Não inoculadas	0,17 a	0,99 a	2,44 a	1,03 a	0,08 a
Inoculadas	0,14 a	0,48 b	1,59 b	0,86 a	0,28 a
CV	11,39%				

2° Ensaio Experimental						
Inoculação	Culturas					
	Canola	Cártamo	Crambe	Girassol	Nabo F.	Níger
7 dias após a inoculação						
Não inoculadas	0,44 a	2,14 a	5,92 a	2,71 a	0,68 a	2,65 a
Inoculadas	0,40 a	2,13 a	5,73 a	2,42 a	0,16 b	2,76 a
CV	9,56%					
14 dias após a inoculação						
Não inoculadas	0,91 a	2,13 a	4,83 a	2,37 a	1,88 a	1,86 a
Inoculadas	0,46 a	1,96 a	4,70 a	2,00 a	0,42 b	2,21 a
CV	14,58%					
21 dias após a inoculação						
Não inoculadas	1,78 a	2,38 a	2,20 a	1,76 a	2,26 a	0,82 a
Inoculadas	1,33 a	2,21 a	1,87 a	1,39 a	0,71 b	0,89 a
CV	18,31%					
28 dias após a inoculação						
Não inoculadas	3,05 a	2,51 a	0,80 a	0,81 a	1,38 a	0,25 a
Inoculadas	2,09 b	2,35 a	0,66 a	0,38 b	1,36 a	0,29 a
CV	18,01%					

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de agrupamento Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Após o reconhecimento do patógeno, originam-se na planta alterações bioquímicas, como a explosão oxidativa, de modo a promover a formação de uma barreira tóxica contra o patógeno por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (RESENDE et al., 2003). Yang et al. (2007) verificaram que plantas de canola reagiram à inoculação por meio da explosão oxidativa e observaram ainda, um aumento no influxo de Ca^{2+} para as células guarda dos estômatos, enquanto Klüsener et al. (2002) observaram que o peróxido de hidrogênio atua como um intermediário de sinalização para o ácido abscísico (ABA). O aumento nos níveis de ambos, Ca^{2+} e ABA, estão envolvidos na promoção do fechamento estomático, provavelmente, em uma tentativa de se evitar a entrada de *S. sclerotiorum*. O aumento nas concentrações de ABA pode estar associado à menor TC constatada nas plantas inoculadas, pois a diminuição na condutância estomatal induzida por ABA, implica em redução na atividade fotossintética e consequentemente, menor crescimento das plantas.

Em plantas de nabo forrageiro e canola, como mencionado anteriormente, foi verificado um processo de cicatrização no local da inoculação, cessando o progresso da doença, o que explicaria a semelhança na TC mensurada aos 14, 21 e 28 DAI. A morte de várias plantas de girassol e cártamo impossibilitaram a coerência nas quatro avaliações de crescimento realizadas, enquanto que no patossistema crambe/*S. sclerotiorum* o progresso da doença ocorreu de forma mais lenta, porém, constante, evidenciado pela diferença significativa em todos os períodos após a inoculação.

No 2E, a ausência de ferimento nas hastes das plantas, proporcionou irregularidade no período de infecção das culturas, o que implicaria na necessidade de se estender o período de avaliação para se obter maior regularidade na TC. Esse fato torna-se evidente ao se observar os crescentes percentuais de redução da TC de plantas de crambe e girassol com o decorrer do período após a inoculação, proporcionando, aos 28 DAI, 17,5 e 53,1% de redução, respectivamente, todavia, diferença significativa foi observada apenas em girassol. A diferença verificada em canola, provavelmente, estaria relacionada ao gasto energético investido nos mecanismos de defesa da planta contra o patógeno, visto que os danos provocados por *S. sclerotiorum* foram pouco relevantes.

Independente da metodologia utilizada na inoculação nota-se na Tabela 4, redução de 11,4 e 10,1% no índice relativo de clorofila (IRC) de plantas de cártamo inoculadas no 1E e 2E, respectivamente. Para girassol, significativa redução no IRC foi constatada apenas no primeiro ensaio. Resultados semelhantes foram observados por Perveen et al. (2010) em plantas de hortelã pimenta (*Mentha arvensis*). Segundo os autores a secreção de ácido oxálico

por *S. sclerotiorum* pode provocar a degeneração dos cloroplastos pela ruptura de suas membranas, resultando em uma diminuição no teor de clorofila.

Torna-se importante salientar, independente da metodologia utilizada na inoculação, a menor severidade de mofo branco nas plantas de nabo forrageiro, todavia, os resultados dos caracteres fisiológicos e de rendimento verificados para a cultura, devem ser considerados com ressalvas, pois a desuniformidade fenotípica apresentada pela cultivar impossibilitou a coerência dos dados.

A redução na taxa de crescimento provocada pelo patógeno, no 1E, foi determinante nos menores valores observados para a altura de plantas de girassol, cártamo e crambe no florescimento. O pequeno intervalo de tempo entre a inoculação e o florescimento, aliado ao fato de ser justamente no florescimento, o estádio onde ocorre a maior demanda por fotoassimilados, tornam o período, crítico para o desenvolvimento das plantas doentes. Com exceção à cultura de girassol, devido à morte das plantas, o comportamento se manteve por ocasião da colheita, onde a medida da altura de plantas também indicou interferência negativa da inoculação com o patógeno.

Os danos provocados por *S. sclerotiorum*, em ambos os ensaios, resultaram em redução na massa seca da parte aérea (MSPA) de plantas de cártamo, em um percentual de 12,7 e 13,7%, no primeiro e segundo ensaio, respectivamente (Tabela 4). Apesar da ausência de diferença significativa, vale destacar os 13,2% de redução na MSPA de plantas de crambe no 1E e os percentuais de 13,1 em crambe e 14,6 em girassol, comparando-se as plantas inoculadas com disco de micélio àquelas não inoculadas. Os danos de *S. sclerotiorum* na massa seca da parte aérea das plantas têm-se mostrado ainda mais significativos em outras culturas, verificando-se redução de 40,3% em plantas de hortelã (PERVEEN et al., 2010) e 42,5% em pepino (*Cucumis sativus*) (ETHUR et al., 2005).

A colonização das hastes das culturas pelo patógeno interfere na translocação dos fotoassimilados na planta, proporcionando menor acúmulo de massa seca da parte aérea e de raízes. Dentre os caracteres fisiológicos analisados, os maiores percentuais de redução, ocasionados pelo fungo, foram constatados para a massa seca de raiz, destacando-se os valores de 20,2% encontrados em cártamo e 29,9% em crambe no 1E, e no 2E, 19,2, 22,0, 35,3 e 36,7% verificados em cártamo, níger, crambe e girassol, respectivamente. No entanto, salienta-se que a diferença foi significativa apenas para as duas últimas culturas citadas. Os danos ocasionados por *S. sclerotiorum* ao sistema radicular das plantas são coerentes àqueles relatados em outras culturas, como as reduções de 29,7% na massa seca de raízes de pepino (ETHUR et al., 2005) e os 42,9% verificados em hortelã (PERVEEN et al., 2010).

TABELA 4. Índice relativo de clorofila, altura de plantas no florescimento e na colheita, massa seca da parte aérea e de raiz de culturas inoculadas comparada as não inoculadas com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.

1° Ensaio Experimental					
Inoculação	Culturas				
	Canola	Cártamo	Crambe	Girassol	Nabo F.
	Índice Relativo de Clorofila				
Não inoculadas	37,3 a	44,6 a	30,6 a	31,9 a	30,4 a
Inoculadas	35,6 a	39,5 b	32,3 a	29,2 b	31,5 a
CV	2,85%				
	Altura de Plantas no Florescimento (cm)				
Não inoculadas	34,2 a	114,5 a	76,5 a	123,7 a	75,4 a
Inoculadas	32,2 a	97,4 b	63,4 b	85,5 b	68,8 a
CV	7,53%				
	Altura de Plantas na Colheita (cm)				
Não inoculadas	132,2 a	116,8 a	165,4 a		151,2 a
Inoculadas	130,1 a	98,0 b	140,4 b		144,2 a
CV	6,88%				
	Massa Seca da Parte Aérea (g)				
Não inoculadas	3,61 a	9,26 a	5,69 a		4,32 a
Inoculadas	3,21 a	8,08 b	4,94 a		3,73 a
CV	7,54%				
	Massa Seca de Raiz (g)				
Não inoculadas	2,15	3,12	1,77		4,09
Inoculadas	2,09	2,49	1,24		3,85
CV	10,79%				

2° Ensaio Experimental						
Inoculação	Culturas					
	Canola	Cártamo	Crambe	Girassol	Nabo F.	Níger
	Índice Relativo de Clorofila					
Não inoculadas	38,1 a	45,5 a	33,1 a	32,0 a	31,6 a	33,7 a
Inoculadas	37,6 a	40,9 b	33,1 a	31,2 a	32,1 a	32,5 a
CV	2,25%					
	Altura de Plantas no Florescimento (cm)					
Não inoculadas	57,9	119,2	66,7	101,8	68,3	55,7
Inoculadas	56,2	114,6	63,8	91,9	63,3	56,6
CV	8,39%					
	Altura de Plantas na Colheita (cm)					
Não inoculadas	115,2	119,7	121,0	100,8	169,1	81,3
Inoculadas	122,0	114,3	115,4	92,7	175,3	88,5
CV	6,91%					
	Massa Seca da Parte Aérea (g)					
Não inoculadas	4,48 a	7,82 a	5,13 a	5,83 a	4,92 a	5,22 a
Inoculadas	4,65 a	6,75 b	4,46 a	4,98 a	5,18 a	4,86 a
CV	8,48%					
	Massa Seca de Raiz (g)					
Não inoculadas	1,81 a	1,93 a	1,84 a	1,58 a	2,01 a	0,91 a
Inoculadas	1,55 a	1,56 a	1,19 b	1,00 b	2,07 a	0,71 a
CV	10,97%					

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de agrupamento Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Verifica-se, na Tabela 5, que o fungo *S. sclerotiorum* causou significativa redução no rendimento das culturas em relação às plantas não inoculadas.

TABELA 5. Quantificação dos danos nos componentes do rendimento de culturas inoculadas comparada as não inoculadas com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.

1° Ensaio Experimental				
	Culturas			
Inoculação	Canola	Cártamo	Crambe	Nabo F.
	Número de Síliqua/Capítulo por Planta			
Não inoculadas	51,6 a	2,7 a	-	8,6 b
Inoculadas	45,2 b	0,3 b	-	13,1 a
CV	14,07%			
	Número de Sementes/Síliqua ou Capítulo			
Não inoculadas	9,48	9,83	-	2,04
Inoculadas	9,92	8,40	-	2,16
CV	15,47%			
	Massa de Cem Grãos (g)			
Não inoculadas	0,34 a	5,25* a	1,20 a	1,33* a
Inoculadas	0,31 a	4,81* b	0,88 b	1,31* a
CV	5,44%			
	Rendimento (g.planta^{-1})			
Não inoculadas	1,46 a	1,20 a	2,00 a	0,23 a
Inoculadas	1,28 a	0,10 b	1,34 b	0,39 a
CV	11,04%			

2° Ensaio Experimental						
	Culturas					
Inoculação	Canola	Cártamo	Crambe	Girassol	Nabo F.	Níger
	Número de Síliqua/Capítulo					
Não inoculadas	46,0 a	2,5 a	-	1,0 a	10,8 a	37,3 a
Inoculadas	42,0 a	2,3 a	-	0,7 a	5,8 b	32,9 a
CV	11,76%					
	Número de Sementes/Síliqua ou Capítulo					
Não inoculadas	7,95 a	21,08 a	-	41,5 a	2,58 a	1,50 a
Inoculadas	7,06 a	23,39 a	-	21,0 b	1,86 a	1,54 a
CV	33,07%					
	Massa de Cem Grãos (g)					
Não inoculadas	0,32 a	4,47* a	0,91 a	3,00* a	1,36* a	0,61* a
Inoculadas	0,31 a	3,87* b	0,97 a	2,58* a	1,43* a	0,52* a
CV	7,19%					
	Rendimento (g.planta^{-1})					
Não inoculadas	1,16 a	2,01 a	1,87 a	1,21 a	0,37 a	0,33 a
Inoculadas	1,06 a	1,60 b	1,53 b	0,55 b	0,14 a	0,26 a
CV	8,06%					

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

*Valores estimados.

Constataram-se, no 1E, perdas severas, 91,7%, na cultura do cártamo. Esse decréscimo pode ser atribuído ao conjunto dos percentuais de redução observados para os componentes do rendimento da cultura, citando-se os 8,4% na massa de 100 grãos, 14,6% no número de sementes por capítulo e principalmente, 88,9% no número de capítulos por planta. Vale destacar, apesar da ausência de comparação em virtude da morte das plantas na testemunha, que todas as plantas de girassol inoculadas, no primeiro ensaio experimental, morreram, provocando a perda total no rendimento da cultura.

Notou-se, em plantas de crambe, massa 26,8% inferior nas amostras de 100 grãos e um decréscimo de 33,0% no rendimento da cultura. Somando-se aos prejuízos observados no rendimento da cultura, constatou-se ainda, a transmissão de *S. sclerotiorum* às sementes de crambe em percentuais de 0,5%. A taxa pode ser considerada baixa, porém, sabe-se que a semente infectada está entre os principais meios de introdução do patógeno em novas áreas (Capítulo II). A transmissão constatada em crambe está associada ao crescimento do micélio fúngico, que ao disseminar-se sobre o tecido do hospedeiro entra em contato direto com as sementes da cultura que são produzidas ao longo das hastes da planta. Deste modo, pode-se inferir que mais importante do que a severidade da doença para a transmissão, seria a localização do patógeno sobre o hospedeiro.

No 2E, os prejuízos causados por *S. sclerotiorum* foram mais relevantes na cultura do girassol, constatando-se 54,6% de redução no rendimento das plantas quando inoculadas, evidenciado, principalmente, pelo decréscimo de 30,0 e 49,4% no número de capítulos por planta e número de sementes por capítulo, respectivamente. Assim como verificado no primeiro ensaio experimental, as culturas de cártamo e crambe também apresentaram significativa redução no rendimento por planta, relatando-se valores de 20,4 e 18,2%, respectivamente.

As reduções na produção dependem da fase de crescimento em que as plantas são infectadas (HAHN, 2002), porém, independente do estádio fenológico, tem sido relatado efeitos negativos da infecção de *S. sclerotiorum*. Del Río et al. (2007) verificaram redução média de 13,13 $kg.ha^{-1}$ para cada ponto percentual de incidência de podridão de Sclerotinia em canola, enquanto que Mündel et al. (1985), avaliando a resistência de plantas de cártamo a *S. sclerotiorum*, observaram por duas safras seguidas, redução média de 340 $kg.ha^{-1}$ no rendimento das plantas. Corroborando com os resultados, Danielson et al. (2004), em trabalho com inoculação de cultivares de soja em dois estádios de crescimento, verificaram dados consistentes que evidenciaram a redução no rendimento da cultura, ocasionado por *S.*

sclerotiorum, por duas safras consecutivas, no entanto, relataram que as perdas nos componentes do rendimento apresentaram efeito variável.

A inoculação das plantas de níger não proporcionou diferença significativa para nenhuma variável fisiológica ou de rendimento, entretanto, podem ser observadas reduções na massa seca, tanto da parte aérea (6,9%), como de raízes (22,0%), no número de capítulos por planta (11,8%), massa de 100 grãos (14,8%) e no rendimento (21,2%), o que torna plausível inferir, que o maior benefício na utilização da cultura quando comparado às demais com percentual de redução semelhante, seria o fato da espécie não multiplicar o patógeno.

1.4 CONCLUSÕES

Sclerotinia sclerotiorum é patogênico as culturas: girassol, cártamo, crambe, níger, canola e nabo forrageiro.

Plantas de girassol apresentam maior suscetibilidade a *Sclerotinia sclerotiorum*.

Plantas de nabo forrageiro e canola apresentam mecanismos de defesa em resposta ao processo infectivo de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Constata-se maior resistência a *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de nabo forrageiro.

A infecção por *Sclerotinia sclerotiorum* provoca perdas relevantes no rendimento das culturas do girassol, cártamo e crambe.

Constata-se transmissão de 0,5% de *Sclerotinia sclerotiorum* às sementes de crambe.

1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUCLAIR, J.; BOLAND, G. J.; KOHN, L. M.; RAJCAN, I. Genetic interactions between *Glycine max* and *Sclerotinia sclerotiorum* using a straw inoculation method. **Plant Disease**, v.88, n.8, p.891-895, 2004.

BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.16, n.2, p.93-108, 1994.

BRADLEY, C. A.; DEL RÍO, L. E.; JOHNSON, B. L. First report of *Sclerotinia sclerotiorum* on niger (*Guizotia abyssinica*). **Plant Disease**, v.87, n.5, p.602, 2003.

BRADLEY, C. A.; HENSON, R. A.; PORTER, P. M.; LE GARE, D. G.; DEL RÍO, L. E.; KHOT, S. D. Response of canola cultivars to *Sclerotinia sclerotiorum* in controlled and field environments. **Plant Disease**, v.90, n.2, p.215-219, 2006.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: Wiley - Interscience, 1990. 532p.

CARPENTER, M. A.; FRAMPTON, C.; STEWART, A. Genetic variation in New Zealand populations of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v.27, n.1, p.13-21, 1999.

COTTON, P.; KASZA, Z.; BRUEL, C.; RASCLE, C.; FÈVRE, M. Ambient pH controls the expression of endopolygalacturonase genes in the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **FEMS Microbiology Letters**, v.227, n.2, p.163-169, 2003.

DANIELSON, G. A.; NELSON, B. D.; HELMS, T. C. Effect of Sclerotinia stem rot on yield of soybean inoculated at different growth stages. **Plant Disease**, v.88, n.2, p.297-300, 2004.

DEL RÍO, L. E.; BRADLEY, C. A.; HENSON, R. A.; ENDRES, G. J.; HANSON, B. K.; MCKAY, K.; HALVORSON, M.; PORTER, P. M.; LE GARE, D. G.; LAMEY, H. A. Impact of Sclerotinia stem rot on yield of canola. **Plant Disease**, v.91, n.2, p.191-194, 2007.

DICKMAN, M. B. Approaches for improvement crop to soil-borne fungal diseases through biotechnology using *Sclerotinia sclerotiorum* as a case study. **Australasian Plant Pathology**, v.36, n.2, p.116-123, 2007.

DIERS, B. W.; KOPISCH-OBUCH, F. J.; HOFFMAN, G. L.; HARTMAN, W. L.; PEDERSEN, W. L.; GRAU, C. R.; WANG, D. Registration of AxN-1-55 soybean germplasm with partial resistance to Sclerotinia stem rot. **Crop Science**, v.46, n.3, p.1403-1404, 2006.

ETHUR, L. Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.; 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.

GARG, H.; ATRI, C.; SANDHU, P. S.; KAUR, B.; RENTON, M.; BANGA, S. K.; SINGH, H.; SINGH, C.; BARBETTI, M. J.; BANGA, S. S. High level of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in introgression lines derived from hybridization between wild crucifers and the

crop *Brassica* species *B. napus* and *B. juncea*. **Field Crops Research**, v.117, n.1, p.51-58, 2010b.

GARG, H.; LI, H.; SIVASITHAMPARAM, K.; KUO, J.; BARBETTI, M. J. The infection processes of *Sclerotinia sclerotiorum* in cotyledon tissue of a resistant and a susceptible genotype of *Brassica napus*. **Annals of Botany**, v.106, n.6, p.897-908, 2010a.

GASPERI, A. C. **Variabilidade de isolados, reação de cultivares e danos causados por *Fusarium solani* f. sp. *glycines***. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2000. 91p.

GIRARD, V.; FÈVRE, M.; BRUEL, C. Involvement of cyclic AMP in the production of the acid protease Acp1 by *Sclerotinia sclerotiorum*. **FEMS Microbiology Letters**, v.237, n.2, p.227-233, 2004.

GUIMARÃES, R. L.; STOTZ, H. U. Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. **Plant Physiology**, v.136, n.11, p.3703-3711, 2004.

HAHN, V. Genetic variation for resistance to Sclerotinia head rot in sunflower inbred lines. **Field Crops Research**, v.77, n.2, p.153-159, 2002.

KLÜSENER, B.; YOUNG, J. J.; MURATA, Y.; ALLEN, G. J.; MORI, I. C.; HUGOUVIEUX, V.; SCHROEDER, J. I. Convergence of calcium signaling pathways of pathogenic elicitors and abscisic acid in Arabidopsis guard cells. **Plant Physiology**, v.130, n.4, p.2152-2163, 2002.

KOCH, E. F. A.; MENTEN, J. O. M. Método alternativo para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.26, n.2, p.276-279, 2000.

LEITE, B.; RONCATO, L. D. B.; PASCHOLATI, S. F.; LAMBAIS, M. R. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungos patogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.5, p.235-280, 1997.

LU, G. Engineering *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in oilseed crops. **African Journal of Biotechnology**, v.2, n.12, p.509-516, 2003.

MUELLER, D. S.; HARTMAN, G. L.; PEDERSEN, W. L. Development of sclerotia and apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* from infected soybean seed and its control by fungicide seed treatment. **Plant Disease**, v.83, n.12, p.1113-1115, 1999.

MÜNDEL, H. H.; HUANG, H. C.; KOZUB, G. C. Sclerotinia head rot in safflower: assessment of resistance and effects on yield and oil content. **Canadian Journal of Plant Science**, v.65, n.2, p.259-265, 1985.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: The Mac Millan Press, 1979. v.2. 1191p.

PEDRAS, M. S. C.; ZHENG, Q. A.; SARMA-MAMILLAPALLE, V. K. The phytoalexins from Brassicaceae: structure, biological activity, synthesis and biosynthesis. **Natural Product Communications**, v.2, n.3, p.319-330, 2007.

PELUFFO, L.; LIA, V.; TROGLIA, C.; MARINGOLO, C.; NORMA, P.; ESCANDE, A.; H. HOPP, E.; LYTOVCHENKO, A.; FERNIE, A. R.; HEINZ, R.; CARRARI, F. Metabolic profiles of sunflower genotypes with contrasting response to *Sclerotinia sclerotiorum* infection. **Phytochemistry**, v.71, n.1, p.70-80, 2010.

PERVEEN, K.; HASEEB, A.; SHUKLA, P. K. Effect of *Sclerotinia sclerotiorum* on the disease development, growth, oil yield and biochemical changes in plants of *Mentha arvensis*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.17, n.4, p.291-294, 2010.

PRATS, E.; BAZZALO, M. E.; LEÓN, A.; JORRÍN, J. V. Accumulation of soluble phenolic compounds in sunflower capitula correlates with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Euphytica**, v.132, n.3, p.321-329, 2003.

PRATS, E.; GALINDO, J. C.; BAZZALO, M. E.; LEÓN, A.; MACÍAS, F. A.; RUBIALES, D.; JORRÍN, J. V. Antifungal activity of a new phenolic compound from capitulum of a head rot-resistant sunflower genotype. **Journal of Chemical Ecology**, v.33, n.12, p.2245-2253, 2007.

REIMONTE, G.; CASTAÑO, F. Susceptibility of sunflower hybrids (*Helianthus annuus*) to mid stem rot and broken stem caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Ciencia e Investigación Agraria**, v.35, n.1, p.27-35, 2008.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.2, p.123-130, 2003.

ROUSSEAU, G.; THANH, T. H.; DOSTALER, D.; RIOUX, S. Greenhouse and field assessments of resistance in soybean inoculated with sclerotia, mycelium, and ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.84, n.2, p.615- 623, 2004.

SAHARAN, G. S.; MEHTA, N. **Sclerotinia diseases of crop plants**: biology, ecology and disease management. LXII. Springer:Verlag GmbH, Heidelberg, 2008. 486p.

SILVA, P. R. F.; FREITAS, T. F. S. Biodiesel: o ônus e o bônus de produzir combustível. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.3, p.843-851, 2008.

WEGULO, S. N.; YANG, X. B.; MARTINSON, C. A. Soybean cultivar responses to *Sclerotinia sclerotiorum* in field and controlled environment studies. **Plant Disease**, v.82, n.11, p.1264-1270, 1998.

YANG, B.; SRIVASTAVA, S.; DEYHOLOS, M. K.; KAV, N. N. V. Transcriptional profiling of canola (*Brassica napus* L.) responses to the fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Science**, v.173, n.2, p.156-171, 2007.

ZHAO, J.; PELTIER, A. J.; MENG, J.; OSBORN, T. C.; GRAU, C. R. Evaluation of Sclerotinia stem rot resistance in oilseed *Brassica napus* using a petiole inoculation technique under greenhouse conditions. **Plant Disease**, v.88, n.9, p.1033-1039, 2004.

CAPÍTULO II

INOCULAÇÃO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM SEMENTES DE OLEAGINOSAS: TRANSMISSÃO E SEUS EFEITOS SOBRE A EMERGÊNCIA DE PLANTAS

RESUMO: A associação de fungos às sementes pode representar importante fonte de inóculo no campo e por meio da transmissão às plântulas, prejudicar o estabelecimento e desenvolvimento das culturas. O trabalho propôs-se a verificar a transmissibilidade de *Sclerotinia sclerotiorum* de sementes de canola, cártamo, crambe, girassol, nabo forrageiro e níger inoculadas artificialmente e suas implicações na emergência de plântulas. O isolado fúngico, coletado em lavoura de soja e multiplicado em cenoura, foi repicado em placas de Petri contendo meio BDA, incubado a 20ºC e fotoperíodo de 12 horas. Após o crescimento do patógeno, foram colocadas 50 sementes das culturas em cada placa, onde permaneceram por um período de 20 horas. Como testemunha utilizaram-se sementes incubadas nas mesmas condições, porém apenas em meio BDA. O ensaio foi conduzido em sala climatizada, temperatura de 24ºC e umidade de 70%. As sementes foram semeadas em bandejas contendo 8,5 dm^3 de solo (Latossolo Vermelho Distroférrico). Aos quinze dias após a semeadura foi quantificado o índice de velocidade de emergência e o percentual de emergência e tombamento. A comprovação da transmissão foi realizada em meio Neon. Observou-se que *S. sclerotiorum* pode ser transmitido para as plântulas das culturas quando associado às suas sementes, sendo uma importante fonte de inóculo. O fungo provocou tombamento de pré e pós-emergência em todas as espécies estudadas e por meio do teste Neon pode-se inferir que o dano foi ocasionado pela inoculação com o patógeno. Exceção à cultura da canola constatou-se redução na emergência e no índice de velocidade de emergência das culturas.

Termos para indexação: taxa de transmissão, fonte de inóculo, teste Neon

INOCULATION OF *Sclerotinia sclerotiorum* IN SEED OF OLEAGINOUS PLANTS: TRANSMISSION AND EFFECTS ON EMERGENCE

ABSTRACT: The seed-fungi association may represent an important source of inoculum in the field and pathogen transmission to seedlings, affecting the establishment and development of crops. The study aimed to verify the transmission of *Sclerotinia sclerotiorum* of rapeseed, safflower, crambe, sunflower, radish and niger seed (artificially inoculated) and its implications on seedling emergence. The fungal isolate, collected in the soybean crop and multiplied in carrot was peaked in Petri dishes containing PDA medium and incubated at 20°C and 12 hours photoperiod. After the growth of the pathogen, 50 seeds were placed on each plate cultures where they remained for a period of 20 hours. As a control we used seeds incubated under the same conditions, but only on PDA. The test was conducted in a climatic chamber at 24°C and 70% humidity. The seeds were sown in trays containing 8.5 dm^3 of soil (Rhodic Acrustox). At fifteen days after sowing, speed index of emergency and percentage of emergency and damping-off were quantified. Evidence of transmission was held in Neon culture medium. It was observed that *S. sclerotiorum* can be transmitted to seedlings of crops when associated with its seeds, being an important source of inoculum. The fungus caused damping-off in all of the studied species and by testing on Neon medium can be inferred that the damage was caused by inoculation with the pathogen. Exception to the rapeseed crop, it was found reduction in the emergency and speed index of emergence of cultures.

Index terms: transmission rate, source of inoculum, Neon test

2.1 INTRODUÇÃO

Com o advento do biodiesel, muitas espécies oleaginosas têm sido comercializadas e cultivadas, sem, no entanto, testes ou fiscalizações que atestem padrões mínimos de qualidade destinados à produção de sementes, o que torna frequente a ocorrência de problemas relacionados a qualidade fisiológica e sanitária das sementes. A grande maioria das culturas está sujeita ao ataque de doenças, sendo grande parte dos seus agentes etiológicos transmitidos pelas sementes. Para Teixeira e Machado (2003) a presença de patógenos em sementes relaciona-se diretamente à baixa germinação, vigor e deterioração, uma vez que a maioria desses patógenos pode ser transmitida à progênie, causando sérios prejuízos econômicos aos produtores. No entanto, Marino et al. (2008) salientam que a constatação da presença de micro-organismos, mesmo patogênicos, na semente, não é suficiente para garantir a infecção da planta proveniente dessa semente, pois vários são os fatores que influenciam na transmissão.

A expansão das culturas associada à falta de cuidados fitossanitários, como sementes infectadas, desempenha importante papel na disseminação e fonte de inóculo para cultivos posteriores, sendo responsável pela introdução de patógenos em áreas indenes (VENTUROSO et al., 2008). Do ponto de vista fitopatológico, a importância da associação patógeno-semente não reside apenas no fato de ser mais um processo de disseminação, mas, também, por se constituir em um meio de sobrevivência do patógeno em contato direto com o hospedeiro, assegurando a introdução do patógeno já nos primeiros estágios de desenvolvimento da planta (SANTOS et al., 1996).

Entre os patógenos disseminados por sementes destaca-se o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal da doença conhecida como mofo branco. Este patógeno pode ser transmitido, associado às sementes na forma de micélio dormente ou acompanhando o lote por meio de estruturas de resistência, chamadas escleródios. Infecção de sementes tem sido relatada em alguns hospedeiros, os quais incluem feijão, soja e girassol (TU, 1988; YANG et al., 1998; MUELLER et al., 1999). Os resultados de Ben-Yephet e Bitton (1985) onde relataram que até 90% dos ascósporos, a fonte de inóculo primário, permanecem dentro de 100 metros do local de dispersão, possibilita enfatizar o maior potencial patogênico de disseminação a longas distâncias, por meio de sementes infectadas comparado a ejeção de ascósporos.

O bom desempenho de uma cultura depende da qualidade das suas sementes, pois elas contêm todo o potencial genético que a planta pode expressar (MENEZES et al., 2011).

O uso de sementes com boa qualidade e dentro dos padrões estabelecidos para as principais culturas e doenças está entre as melhores estratégias para diminuir a disseminação de patógenos. Nesse sentido, esteve em consulta pública, pelo Ministério da Agricultura na Portaria nº 47, de 26 de fevereiro de 2009 (Diário Oficial 40, seção 1, pág. 10 e 11 de 02/03/2009), o padrão zero para *S. sclerotiorum* em sementes de feijão, soja e girassol, não podendo haver nenhum escleródio no exame da amostra de sementes secas, todavia, o texto não menciona a infecção de sementes por micélio fúngico, outro inóculo com potencial para transmissão da doença.

No Brasil tem-se verificado a preocupação com relação à infecção das sementes por micélio de *S. sclerotiorum*, todavia, a taxa de transmissão do patógeno para muitos de seus hospedeiros ainda não foi quantificada, tampouco, tem-se relacionado a infecção fúngica com o vigor de sementes e desenvolvimento de plantas. Diante do contexto, o trabalho propôs-se a verificar a transmissibilidade de *S. sclerotiorum* de sementes de canola, cártamo, crambe, girassol, nabo forrageiro e níger inoculadas artificialmente, assim como sua relação e implicações na emergência de plântulas.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* foram coletados em lavoura de soja e submetidos à assepsia em álcool 50% e hipoclorito de sódio a 1,0%, ambos por um minuto, e lavados com água destilada e esterilizada, sendo acondicionados, posteriormente, em câmara de fluxo de ar para secagem. O isolado fúngico foi multiplicado em cenoura, por meio do acondicionamento de 100 g de cenoura, cortadas em rodela, em erlenmeyers, o qual foi autoclavado por 20 minutos a 120°C. Após seu resfriamento, discos colonizados com micélio do patógeno foram depositados sobre o substrato e incubado a 20°C (±2ºC) sob escuro contínuo, permanecendo nestas condições até a formação dos escleródios. Os escleródios produzidos foram repicados em placas de Petri contendo meio BDA, as quais foram vedadas com filme plástico e incubadas em BOD a uma temperatura de 20ºC (±2ºC) e fotoperíodo de 12 horas, para promover a colonização do meio de cultura pelo patógeno.

Depois do crescimento do patógeno, 50 sementes de cada cultura, canola (*Brassica napus* var. *oleifera*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), crambe (*Crambe abssynica*), girassol (*Helianthus annuus*), nabo forrageiro (*Raphanus sativus* var. *oleiferus*) e níger (*Guizotia abyssinica*), previamente desinfestadas, como mencionado para os escleródios, foram depositadas em camada única e levemente pressionadas sobre o meio colonizado, onde permaneceram por um período de 20 horas. Como testemunha utilizaram-se sementes incubadas nas mesmas condições, porém apenas em meio BDA. Foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 6 x 2, com 4 repetições.

O ensaio foi conduzido em sala climatizada, temperatura de 24ºC (±1ºC) e umidade de 70%. Foram semeadas 200 sementes por tratamento em bandejas contendo 8,5 dm^3 de solo peneirado, do tipo Latossolo Vermelho Distroférrico, coletado em área não cultivada. O solo foi irrigado, mantendo-se um turno de rega de dois dias, de modo a manter a umidade do solo em 60% da capacidade de campo.

A patogenicidade foi analisada na emergência e pós-emergência, quantificando-se aos quinze dias após a semeadura, o índice de velocidade de emergência (IVE) e o percentual de emergência e tombamento de plântulas. Foi considerada como emergida a semente que demonstrou sua aptidão em produzir uma planta normal sob condições de campo (BRASIL, 2009). O IVE foi calculado pelo somatório dos quocientes resultantes entre o número total de plantas emergidas a cada dia e o número de dias decorridos da semeadura. O percentual de tombamento foi mensurado contando-se o número de plântulas tombadas com ou sem a presença de micélio fúngico em relação ao número de plântulas emergidas.

Para avaliação da transmissibilidade via sementes, do patógeno para as culturas, foram coletadas quinze sementes não emergidas, quinze plântulas tombadas e quinze plântulas assintomáticas, lavadas em água corrente para retirada do solo aderido às mesmas e submetidas à assepsia, adotando-se o mesmo procedimento utilizado para os escleródios. Posteriormente, para comprovação da transmissão, os fragmentos vegetais foram plaqueados em meio Neon (STEADMAN et al., 1994). Em seguida, as placas foram incubadas a 20°C (±2ºC) e fotoperíodo de 12 horas, até a mudança da cor do meio de azul para amarelo. O número de plântulas assintomáticas de crambe, e tombadas de crambe e cártamo foram inferiores aos valores previamente estabelecidos para realização do teste Neon, sendo utilizada, nestes casos, a quantidade de material disponível.

Os dados foram submetidos à análise de variância com auxílio do programa SISVAR, e as médias comparadas pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi verificada interação significativa entre os fatores estudados para as análises de emergência e IVE. As culturas diferiram no percentual de emergência, em ambas as situações, quando inoculadas como também para àquelas não submetidas à inoculação (Tabela 1). Torna-se importante salientar a significativa redução na emergência das plantas de níger, nabo forrageiro, girassol, cártamo e crambe inoculadas com *S. sclerotiorum*, destacando-se as quatro últimas culturas, que apresentaram redução superior a 60% na emergência de plantas.

TABELA 1. Percentual de emergência, índice de velocidade de emergência (IVE) e percentual de redução em relação à testemunha não inoculada (SI) de espécies oleaginosas submetidas à inoculação artificial com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.

Culturas	Emergência (%)		Percentual	IVE		Percentual
	SI	INOC	de redução	SI	INOC	de redução
Canola	98,0 A a	77,0 A a	21,4	11,8 A a	10,6 A a	10,2
Níger	96,1 A a	63,2 B a	34,2	13,1 A a	8,8 B a	32,8
Nabo F.	98,0 A a	34,3 B b	65,0	12,6 A a	10,3 A a	18,3
Girassol	74,0 A b	25,0 B b	66,2	8,4 A c	3,9 B b	53,6
Crambe	79,4 A b	4,4 B c	94,5	9,9 A b	0,7 B d	92,9
Cártamo	58,3 A c	11,8 B c	79,8	7,0 A c	1,9 B c	72,9
CV (%)	11,27			7,58		

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de agrupamento Scott-Knott a 5% de probabilidade.

S. sclerotiorum causou a morte de sementes de todas as culturas estudadas, mesmo antes de iniciarem o processo germinativo, fato que pode estar associado à agressividade e condições favoráveis ao patógeno. A maior quantidade de sementes mortas pelo patógeno foi verificada em crambe, constatando-se apenas 4,4% de emergência para as sementes inoculadas. Semelhantemente ao ocorrido no trabalho, Mueller et al. (1999), também observaram que a maioria das sementes de soja infectadas com *S. sclerotiorum* não germinaram. Inoculando *S. sclerotiorum* em sementes de soja por meio de solução de manitol, Machado et al. (2001) relataram emergência de 20% para sementes colocados em meio sem restrição hídrica, enquanto àquelas submetidas aos potenciais de -0,6, -0,8 e -1,0 MPa

apresentaram mais de 90% de sementes mortas. Os autores enfatizaram que o fungo localiza-se internamente nas sementes, uma vez que em mais de 90% das sementes que foram desinfestadas com hipoclorito detectou-se a presença do fungo. De acordo com Botelho et al. (2008) internamente, fungos podem sobreviver por mais tempo, aumentando também a probabilidade de causarem doença em plantas. Este fato demonstra a maior dificuldade e importância no controle do patógeno quando associado às sementes.

Deve-se enfatizar que mesmo proporcionando condições adequadas ao crescimento e desenvolvimento de *S. sclerotiorum*, a cultura de canola não apresentou redução significativa na emergência de plantas por ocasião da inoculação. Não se pode afirmar que o fato esteja relacionado a algum mecanismo de defesa das plantas ou mesmo ao período latente do patógeno, porém, salienta-se que investigações mais detalhadas merecem ser desenvolvidas. Segundo Botelho et al. (2008) nem sempre a associação de fungos com sementes acarreta doença ou queda na qualidade fisiológica, todavia, esta associação pode favorecer a sobrevivência e disseminação do patógeno.

As culturas de canola, níger e nabo forrageiro apresentaram os maiores índices de velocidade de emergência, tanto as inoculadas como as que não tiveram contato com o patógeno. No entanto, assim como ocorreu para as plantas de girassol, crambe e cártamo, também níger teve sua velocidade de emergência afetada por *S. sclerotiorum*. Todavia, a maior redução, 92,9%, foi verificada na cultura do crambe. A patogenicidade de *S. sclerotiorum* foi evidenciada por meio da redução na velocidade e emergência das plantas. Foi constatada correlação linear positiva e significativa entre o percentual de redução do IVE e da emergência, podendo-se inferir que a menor velocidade de germinação possibilitou maior tempo de contato entre semente e patógeno, aliado ao fato de sementes liberarem certas quantidades de açucares com o atraso da germinação, favoreceram a infecção pelo patógeno e a consequente redução na capacidade germinativa das sementes. Machado et al. (2001) constataram que o aumento do tempo de exposição das sementes ao fungo *S. sclerotiorum*, resultou na morte de todas as sementes de soja.

O fungo provocou tombamento de pré e pós-emergência em todas as culturas estudadas (Figura 1), porém, destaca-se o elevado percentual de tombamento de pós-emergência nas plântulas de nabo forrageiro, provavelmente, associado à alta velocidade com que as plântulas da cultura emergiram, fazendo com que o ataque do patógeno fosse direcionado, principalmente, ao colo das plântulas inoculadas após sua emergência.

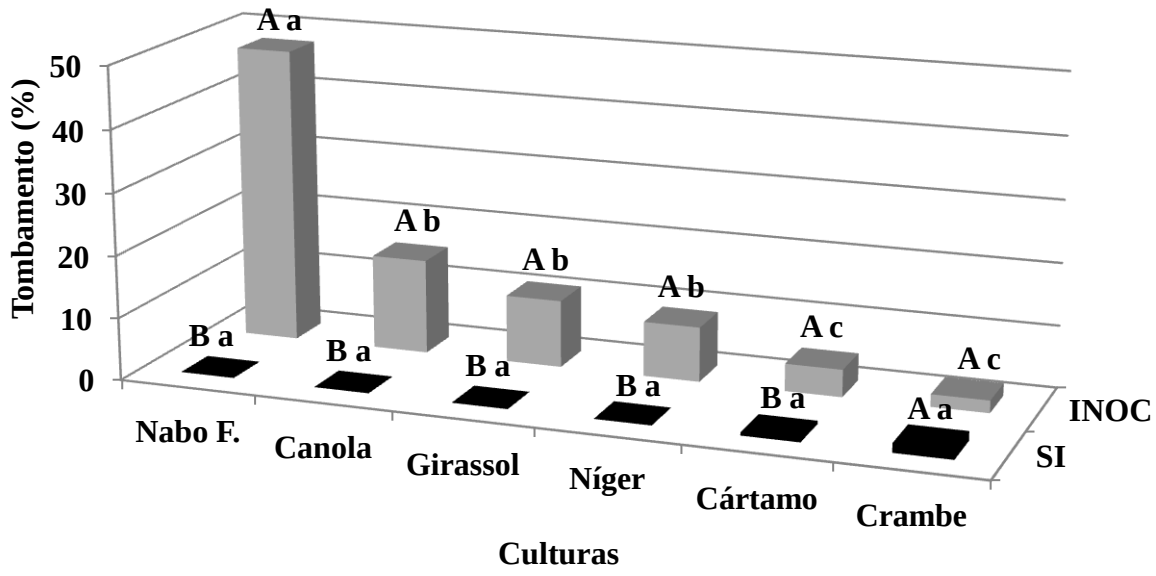

FIGURA 1. Percentual de tombamento pós-emergência de culturas oleaginosas submetidas (INOC) e não (SI) a inoculação com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. (Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade).

Comportamento semelhante, porém em menor intensidade, foi verificado para as culturas da canola, girassol e níger com percentual de tombamento de 15,2, 10,8 e 8,8%, respectivamente. Para o girassol em particular, vale salientar um fato interessante, apesar de comum em muitas dicotiledôneas, onde as plântulas emergiram e permaneceram com o tegumento da semente aderida aos cotilédones, promovendo, desta forma, a transmissão via tegumento-cotilédone após a emergência, o que se poderia denominar de transmissão cotiledonar. Em soja, tem sido relatado, que *S. sclerotiorum* utiliza justamente os cotilédones como fonte de energia para produção de novos escleródios (YANG et al., 1998). Esta situação foi observada apenas em girassol, e ajuda a explicar o fato da cultura ter sua velocidade de emergência reduzida em 53,6% e ainda assim apresentar percentual de tombamento similar às culturas que não tiveram IVE significativamente reduzido pelo patógeno. Como *S. sclerotiorum* pode sobreviver saprofiticamente, sua manutenção no tegumento das sementes, quando próximo aos tecidos vegetais, representa efetiva fonte de inóculo do patógeno no solo.

Somente para a cultura do crambe foi observado tombamento de plântulas para as sementes não inoculadas. As referidas plântulas foram colocadas em câmara úmida, sendo constatado a presença do fungo *Alternaria* sp. Em ensaios preliminares também foi verificado a associação de *Alternaria* sp. às sementes de crambe e cártamo, provocando tombamento em ambas as culturas. A transmissão de *Alternaria* a partir de sementes infectadas também foi

verificada em outras culturas, como coentro (REIS et al., 2006) e feijão (MORAES e MENTEN, 2006).

A patogenicidade do fungo associado às sementes e plântulas foi comprovada por meio do teste Neon (Figura 2), evidenciado pela detecção do patógeno em todas as sementes e plântulas sintomáticas plaqueadas sobre o meio de cultura (Tabela 2). O teste revelou que o patógeno pode ser transmitido para as plântulas das culturas quando associado às suas sementes, sendo uma importante fonte de inóculo em condições favoráveis ao patógeno.

FIGURA 2. Teste Neon em girassol: (A) Plântulas com tombamento de pré-emergência; (B) Plântulas assintomáticas; (C) Sementes e plântulas com tombamento de pós-emergência.

TABELA 2. Detecção de *Sclerotinia sclerotiorum*, inoculado artificialmente, em sementes e plântulas de culturas oleaginosas coletadas quinze dias após a semeadura.

Culturas	Percentual de sementes infectadas (Nº sementes coletadas)	Percentual de plântulas tombadas (Nº coletado)	Percentual de plântulas assintomáticas infectadas (Nº coletado)
Canola	100 (15)	100 (15)	0 (15)
Cártamo	100 (15)	100 (9)	0 (15)
Crambe	100 (15)	100 (4)	0 (9)
Girassol	100 (15)	100 (15)	13,3 (15)
Nabo F.	100 (15)	100 (15)	0 (15)
Níger	100 (15)	100 (15)	6,7 (15)

Sclerotinia sclerotiorum é considerado um patógeno extremamente agressivo, conhecido por colonizar rapidamente o tecido vegetal e causar a morte da planta. Em virtude desse fato e aliado às condições climáticas favoráveis ao patógeno, no interior da sala climatizada, e os tecidos tenros das plântulas, não se esperava constatar infecção do fungo em plantas assintomáticas, como verificado para girassol e níger. Não foi encontrado na literatura outro relato de que *S. sclerotiorum* pode apresentar infecção latente.

Por ocasião da coleta das sementes para realização do teste Neon, constatou-se em algumas situações a presença de pequenos escleródios (<0,01g) aderidos às sementes não germinadas das culturas. Corroborando com os resultados, tem sido relatada produção de escleródios no solo a partir de sementes de feijão (TU, 1988) e soja (YANG et al., 1998). Mueller et al. (1999) verificaram por duas safras consecutivas em sementes de soja, a produção de escleródios e nas duas oportunidades foi observada germinação carpogênica, sem, contudo, constatarem infecção das plantas na mesma temporada. Para Napoleão et al. (2005) o maior problema em se permitir um aumento da doença é justamente o fato de se aumentar o inóculo para os cultivos subsequentes, o que afetaria a sustentabilidade do sistema de produção em curto prazo.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a possibilidade de *S. sclerotiorum*, quando inoculado nas sementes de canola, cártamo, crambe, girassol, nabo forrageiro e níger, ser transmitido às plântulas de forma eficiente. Henneberg et al. (2011) concluíram que sementes de soja também podem transmitir o fungo às suas plantas, aumentando o potencial de inóculo da doença no campo. Os resultados sugerem que a doença, mofo branco, pode ser introduzida em áreas indenes por meio de sementes infectadas, devendo-se, portanto, dar maior enfoque a testes rápidos e eficientes que venham a identificar sementes infectadas e não apenas a infestação promovida por escleródios. Pelos resultados encontrados no trabalho, sugere-se ainda, que outros testes sejam incluídos na constatação do patógeno e a ampliação do padrão zero de *S. sclerotiorum* para outros hospedeiros e não apenas nos lotes de sementes de girassol, soja e feijão conforme proposto pela portaria nº 47, de 26 de fevereiro de 2009.

2.4 CONCLUSÕES

Constata-se a transmissibilidade de *Sclerotinia sclerotiorum* via sementes inoculadas às plântulas das culturas de canola, cártamo, crambe, girassol, nabo forrageiro e níger.

Sclerotinia sclerotiorum associado às sementes reduz o percentual e a velocidade de emergência das culturas de cártamo, crambe, girassol, nabo forrageiro e níger.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEN-YEPHET, Y.; BITTON, S. Use of a selective medium to study the dispersal of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytoparasitica**, v.13, p.33-40, 1985.

BOTELHO, L. S.; MORAES, M. H. D.; MENTEN, J. O. M. Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa)*: incidência, efeitos na germinação e transmissão para as plântulas. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.4, p.343-348, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399p.

HENNEBERG, L.; JACCOUD FILHO, D. S.; GRZYBOWSKI, C. R. S.; PANOBIANCO, M. Importância da detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja. **Informativo Abrates**, v.21, n.3, p.41-46, 2011.

MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; VIEIRA, M. G. G. C. ALVES, M. C. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos, utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.2, p.95-101, 2001.

MARINO, R. H.; MESQUITA, J. B.; ANDRADE, K. V. S.; COSTA, N. A.; AMARAL, L. A. Incidência de fungos em sementes de *Phaseolus vulgaris* L. provenientes do Estado de Sergipe. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.3, n.1, p.26-30, 2008.

MENEZES, V. O.; PEDROSO, D. C.; PIVETA, G.; MUNIZ, M. F. B.; MENEZES, N. L.; GARCIA, D. C.; ETHUR, L. Z.; SANTOS, R. F.; TUNES, L. M. Detecção e influência de *Fusarium* spp. na qualidade fisiológica de sementes de pepino. **Ciência Rural**, v.41, n.2, p.193-199, 2011.

MORAES, M. H. D.; MENTEN, J. O. M. Transmission of *Alternaria* spp. by common bean seeds and its effects on physiological quality. **Summa Phytopathologica**, v.32, n.4, p.381-383, 2006.

MUELLER, D. S.; HARTMAN, G. L.; PEDERSEN, W. L. Development of sclerotia and apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* from infected soybean seed and its control by fungicide seed treatment. **Plant Disease**, v.83, n.12, p.1113-1115, 1999.

NAPOLEÃO, R.; CAFÉ-FILHO, A. C.; NASSER, L. C. B.; LOPES, C. A.; SILVA, H. R. Intensidade do mofo-branco do feijoeiro em plantio convencional e direto sob diferentes lâminas d'água. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.4, p.374-379, 2005.

REIS, A.; SATELIS, J. F.; PEREIRA, R. S.; NASCIMENTO, W. M. Associação de *Alternaria dauci* e *A. alternata* com sementes de coentro e eficiência do tratamento químico. **Horticultura Brasileira**, v.24, n.1, p.107-111, 2006.

SANTOS, G. R.; COSTA, H.; PELÚZIO, J. M.; MIRANDA, G. V. Transporte, transmissibilidade e patogenicidade da microflora associada às sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Ceres**, v.43, n.249, p.621-627, 1996.

STEADMAN, J. R.; MARCINKOWSKA, J.; RUTLEDGE, A. Semi-selective medium for isolation of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.16, n.1, p.68-70, 1994.

TEIXEIRA, H.; MACHADO, J. C. Transmissibilidade e efeito de *Acremonium strictum* em sementes de milho. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.5, p.1045-1052, 2003.

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**, v.121, n.1, p.40-50, 1988.

VENTUROSO, L. R.; RANGEL, M. A. S.; SOUZA, F. R.; BERGAMIN, A. C.; CONUS, L. A.; COLETA, Q. P. Influência de diferentes classes de infestação por mancha púrpura sobre o vigor de sementes de soja. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v.12, n.1, p.41-48, 2008.

YANG, X. B.; WORKNEH, F.; LUNDEEN, P. First report of sclerotium production by *Sclerotinia sclerotiorum* in soil on infected soybean seeds. **Plant Disease**, v.82, n.2, p.264, 1998.

CAPÍTULO III

RELAÇÃO ENTRE MASSA E LOCALIZAÇÃO DO ESCLERÓDIO NO SOLO COM A GERMINAÇÃO CARPOGÊNICA DE *Sclerotinia sclerotiorum*

RESUMO: Escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* permitem ao fungo conservar seu poder patogênico por vários anos no solo, todavia, são incipientes os estudos que relacionam a massa e a localização dos escleródios no solo com sua patogenicidade. Desta forma, objetivou-se avaliar se a diferença na massa dos escleródios e na sua localização no solo pode interferir na germinação carpogênica de *S. sclerotiorum*. Os escleródios foram pesados e classificados em seis classes, (C1) escleródios com massa inferior a 0,01g, (C2) 0,01<0,02g, (C3) 0,02<0,03g, (C4) 0,03<0,04g, (C5) 0,04<0,05g e (C6) 0,05<0,06g. Depois, foram acondicionados em caixas gerbox contendo solo umedecido até 100% da saturação, sendo alocados na superfície do solo e enterrados a uma profundidade de 3 cm. Os gerbox foram incubados em câmara BOD, temperatura de 20ºC e fotoperíodo de 12 horas. Notou-se maior percentual de germinação carpogênica nos escleródios colocados na superfície do solo em todas as classes analisadas. Foi observada uma tendência em aumentar a germinação carpogênica com o aumento na massa dos escleródios, constatando-se nos escleródios colocados na superfície, germinação de 37,5, 62,5, 75, 87,5, 100 e 100%, enquanto que para os escleródios enterrados foi de 0, 37,5, 37,5, 62,5, 62,5 e 62,5%, nas classes C1, C2, C3, C4, C5 e C6, respectivamente. Ao final das avaliações, os escleródios enterrados apresentaram menor número de estipes e apotécios. Os escleródios C4, C5 e C6, quando na superfície do solo originaram mais estipes e apotécios, enquanto que para os enterrados, apenas os escleródios C5 e C6 proporcionaram maior número de estipes e apotécios por escleródio.

Termos para indexação: massa de escleródio, profundidade de escleródio, fonte de inóculo

RELATIONSHIP BETWEEN MASS AND LOCATION OF SCLEROTIUM IN THE SOIL WITH CARPOGENIC GERMINATION OF *Sclerotinia sclerotiorum*

ABSTRACT: Sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* allow the pathogenic fungus to conserve their viability for several years in the soil, however, there are incipient studies that relate the mass and location of sclerotia in the soil with their pathogenicity. Thus, the objective was to assess whether the difference in mass of sclerotia and their location in the soil can interfere with carpogenic germination of *S. sclerotiorum*. The sclerotia were weighed and classified into six classes (C1) sclerotia with mass less than 0.01 g, (C2) from 0.01<0.02 g, (C3) from 0.02<0.03 g (C4) 0.03<0.04 g (C5) 0.04<0.05 g and (C6) from 0.05<0.06 g. Then, they were placed in gerbox containing soil moistened up to 100% saturation, being allocated to the soil surface and buried to a depth of 3 cm. The gerboxes were incubated in growth chamber, temperature of 20°C and 12 hours photoperiod. It was noted higher percentage of carpogenic germination by sclerotia that were placed on the soil surface in all of the analyzed classes. A tendency was observed in increasing carpogenic germination with the increase in the mass of sclerotia, confirming for the sclerotia placed on the surface germination of 37.5, 62.5, 75, 87.5, 100 and 100%, whereas for the sclerotia buried was 0, 37.5, 37.5, 62.5, 62.5 and 62.5% in C1, C2, C3, C4, C5 and C6, respectively. At the end of the evaluations, the buried sclerotia had fewer stipes and apothecia. The C4, C5 and C6 sclerotia when on the surface of the soil, originated more stipes and apothecia, while for the buried ones only the C5 and C6 sclerotia provided larger number of stems and apothecia by sclerotia.

Index terms: mass of sclerotia, sclerotia depth, source of inoculum

3.1 INTRODUÇÃO

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é um dos patógenos mais importantes do ponto de vista agronômico. O patógeno faz parte de um grupo de fitopatógenos habitantes do solo, de difícil controle, pois sobrevive por anos no solo conservando seu poder patogênico, por meio de estruturas de resistência denominadas escleródios (WILLETTS e BULLOCK, 1992; BUENO et al., 2006).

Os escleródios são estruturas compostas por múltiplas hifas agregadas. Três fases distintas foram reconhecidas durante seu desenvolvimento: a agregação de hifas; o desenvolvimento no tamanho, juntamente com a exsudação de gotículas em sua superfície; e a maturação, envolvendo o delineamento e deposição de melanina, seguido da consolidação interna (TOWNSEND e WILLETTS 1954). A deposição de melanina é responsável pela redução da permeabilidade e proteção do escleródio contra agentes deletérios (WILLETT e BULLOCK, 1992). De acordo com Liang et al. (2010), a indução e desenvolvimento dos escleródios exigem processos metabólicos e fisiológicos específicos, sem os quais, o processo não ocorreria.

Os escleródios são induzidos a germinar, seja de forma miceliogênica, apresentando hifas vegetativas, ou carpogênica, por meio de apotécios capazes de produzir milhões de ascósporos. Ambos podem resultar em infecções nas plantas, todavia, maior potencial epidêmico tem sido verificado pelos ascósporos liberados na germinação carpogênica (BOLTON et al., 2006). Vale salientar que a ocorrência da germinação é determinada pela interação de fatores ambientais, os quais incluem temperatura, umidade do solo e a intensidade de luz (LIU e PAUL, 2007; WU e SUBBARAO, 2008). A germinação dos escleródios também pode ser estimulada, por exsudatos radiculares e pelo microclima formado sob o dossel da espécie hospedeira (GÖRGEN et al., 2010).

Em caso de as condições ambientais não serem favoráveis no campo, os escleródios permanecem viáveis até terem acesso ao substrato preferencial (REIS et al., 2011). Todavia, salienta-se que a viabilidade não deve ser generalizada para diferentes condições edafoclimáticas, pois tem-se verificado divergências no tempo de sobrevivência dos escleródios (WILLETT e BULLOCK, 1992). O sistema de cultivo também apresenta capacidade de afetar a viabilidade das estruturas de resistência, como demonstrado por Reis e Tomazini (2005), que relataram 14 meses em semeadura direta e 36 meses em semeadura convencional.

Outros fatores também agem como condicionantes da germinação carpogênica, como a localização do escleródio no solo (WU e SUBBARAO, 2008), o tamanho dos escleródios (LIU e PAUL, 2007), podendo-se acrescentar a estes a massa dos escleródios. Mueller et al. (2002) demonstraram que a aração profunda diminui a infecção causada por *S. sclerotiorum*, a formação de apotécios e a densidade de escleródio no solo, pois o enterrio destes no perfil do solo possibilita condições inadequadas de germinação.

Liberação de ascósporos e sobrevivência, são, portanto, etapas fundamentais do ciclo de vida de *S. sclerotiorum*. O estudo desses fatores, principalmente àqueles relacionados com o solo, é de grande relevância, visto que aproximadamente 90% do ciclo de vida do patógeno ocorre no solo e, portanto, informações sobre os fatores que venham a interferir nessas etapas não só aumentam a compreensão sobre o patógeno, mas também contribuem para futuras estratégias de controle da doença (CLARKSON et al., 2003).

Diante do exposto, objetivou-se analisar os efeitos na diferença da massa e localização dos escleródios no solo e sua relação com a germinação carpogênica dos escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* coletados em lavoura de soja foram desinfestados, por um minuto, em álcool 50% e hipoclorito de sódio a 1,0%, lavados em água destilada e secos em câmara de fluxo de ar sobre papel filtro. Posteriormente, foram acondicionados em placas de Petri contendo meio BDA e incubados em temperatura de 20°C e fotoperíodo de 12 horas. Para produção dos escleródios, 100 g de cenoura cortadas em rodela foram colocadas em erlenmeyers e autoclavadas por 20 minutos a 120°C. Após seu resfriamento, discos colonizados com micélio do patógeno foram depositados sobre o substrato e incubado a 20°C (±2ºC) sob escuro contínuo, permanecendo nestas condições até a formação dos escleródios.

Os escleródios produzidos foram transferidos para uma peneira e separados do substrato por meio de lavagem em água corrente e secos à temperatura ambiente. Após a secagem das estruturas, as mesmas foram mensuradas em relação a sua massa, em balança de precisão, e classificadas em seis classes, (C1) escleródios com massa inferior a 0,01g, (C2) 0,01<0,02g, (C3) 0,02<0,03g, (C4) 0,03<0,04g, (C5) 0,04<0,05g e (C6) 0,05<0,06g, as quais foram submetidas a duas profundidades: posicionados na superfície e enterrados a 3 cm. Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 6 x 2, com 6 repetições. Cada gerbox correspondeu a uma unidade experimental.

Quarenta e oito escleródios de cada classe foram alocados: na superfície do solo, sendo levemente pressionados; e enterrados com auxílio de um bastão de vidro a uma profundidade de 3 cm, em caixas gerbox preenchidas com solo do tipo Latossolo Vermelho Distroférrico umedecido até 100% da saturação. Procedeu-se a incubação dos gerbox em câmara BOD, a uma temperatura de 20°C (±2ºC) e fotoperíodo de 12 horas.

Observaram-se diariamente as caixas gerbox para constatação da germinação carpogênica. Foram considerados germinados os escleródios com presença de pelo menos um estipe visível sobre o solo a olho nu. As avaliações foram realizadas três dias após a verificação da germinação carpogênica do primeiro escleródio, e a partir de então, em intervalo de sete dias, perfazendo 96 dias de incubação.

A cada avaliação foram mensurados o percentual de germinação carpogênica dos escleródios, computando-se o número de estruturas germinadas em relação ao total de escleródios por caixa gerbox, e o número de estipes e de apotécios por escleródio. As avaliações foram consideradas encerradas após a estabilização na germinação dos escleródios.

Os dados foram transformados em $\sqrt{x} + 1$ e submetidos à análise de variância com auxílio do programa SISVAR, e as médias comparadas pelo teste SNK a 5% de probabilidade.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise estatística dos dados indicou interação significativa para as avaliações do número de estipes e apotécios por escleródio, porém, para a germinação carpogênica houve apenas efeito simples, tanto da localização como da massa dos escleródios. Notou-se maior percentual de germinação carpogênica nos escleródios localizados na superfície do solo em todas as classes analisadas (Tabela 1), verificando-se que o enterrio dos escleródios representou uma redução média de 43,2% na germinação carpogênica.

TABELA 1. Percentual de germinação carpogênica de escleródios de diferentes massas submetidos ao enterrio ou posicionados na superfície do solo.

Posição do Escleródio	Classes de Massa de Escleródios (g)						Média
	< 0,01 C1	0,01<0,02 C2	0,02<0,03 C3	0,03<0,04 C4	0,04<0,05 C5	0,05<0,06 C6	
Superficial	37,5	62,5	75,0	87,5	100,0	100,0	77,1 a
Enterrado	0,0	37,5	37,5	62,5	62,5	62,5	43,8 b
Média	18,8 c	50,0 b	56,3 b	75,0 a	81,3 a	81,3 a	
CV	15,3%						

Médias seguidas pela mesma letra na linha ou coluna, não diferem entre si pelo teste SNK a 5% de probabilidade.

Dentre os fatores que influenciam a germinação, pode-se mencionar a intensidade de luz, a umidade e temperatura do solo (LIU e PAUL, 2007; WU e SUBBARAO, 2008). A disponibilidade hídrica utilizada no trabalho foi favorável à germinação dos escleródios, conforme Napoleão et al. (2007), e desta forma, a temperatura e a luminosidade poderiam ser os fatores preponderantes na menor germinação dos escleródios acondicionados a 3 cm. Todavia, Liu e Paul (2007) demonstraram que escleródios em uma profundidade de 5 a 10 cm sob o solo podem germinar sem luz e que o fato de se enterrar os escleródios no solo não impede sua germinação carpogênica, tampouco, a possibilidade de ocorrência da doença pelo patógeno. No entanto, torna-se importante salientar que o enterrio, mesmo que pouco, proporcionou a menor germinação carpogênica dos escleródios, representando uma significativa redução na fonte de inóculo de *S. sclerotiorum*.

Foi observada uma tendência em aumentar a germinação carpogênica com o aumento na massa dos escleródios, constatando-se para os escleródios das classes C5 e C6 germinação

média de 81,3%, enquanto que para os escleródios da classe C1 a germinação foi de apenas 18,8%, o que representa uma redução de 76,9% em relação às maiores classes. Vale salientar, dentre os valores encontrados, os 100% de germinação carpogênica alcançado pelas classes C5 e C6 quando os escleródios foram distribuídos sobre a superfície do solo e a ausência de germinação para àqueles da classe C1 alocados a 3 cm de profundidade. Hao et al. (2003) avaliando a germinação de escleródios de diferentes tamanhos de *Sclerotinia minor* e *S. sclerotiorum*, verificaram germinação de 100% para os maiores escleródios, ao passo que os menores apresentaram apenas 30% de germinação carpogênica.

Tem sido sugerido que a maior quantidade de reservas dos escleródios estaria relacionada ao seu tamanho. Seria difícil precisar a similaridade da massa dos escleródios com o tamanho dos mesmos, no entanto, se a estrutura de resistência apresenta maior massa, seria plausível afirmar que ela também teria maior quantidade de materiais de reserva, e desta forma, maior possibilidade de germinação, visto que, segundo Görgen et al. (2010), os materiais de reserva são metabolizados, sintetizados e utilizados na formação de estipes e diferenciação dos apotécios.

Na Tabela 2 são apresentados os dados desdobrados do número de estipes por escleródio. Nota-se maior velocidade de germinação e consequente formação de estipes dos escleródios posicionados na superfície do solo, fato evidenciado pela mensuração de estipes, aos 68 dias após a incubação (DAI), em todas as classes de escleródios. Quando as estruturas de resistência foram enterradas, a massa foi o fator diferencial na velocidade com que os estipes se formaram, constatando-se sua presença aos 68 DAI para as classes C5 e C6, aos 75 DAI para C4, enquanto que nos escleródios C2 e C3 os estipes se tornaram visíveis apenas aos 82 dias após a instalação do ensaio.

Independente da localização, observou-se, de modo geral, incremento no número de estipes com o aumento da massa dos escleródios. Para os escleródios colocados na superfície, logo a partir da primeira leitura, foi verificado incremento no número de estipes até as classes C4, C5 e C6, as quais não diferiram entre si. Em relação aos escleródios enterrados, apenas as estruturas classificadas como C5 e C6 apresentaram superioridade comparado aos demais.

Ao final das avaliações, em todas as classes analisadas, constatou-se maior número de estipes por escleródio quando as estruturas de resistência foram colocadas na superfície do solo, sendo verificado um incremento médio de 54,4%. Produzindo escleródios em substrato de cenoura, Costa e Costa (2006) verificaram maior número de estipes por escleródio que os encontrados na referente pesquisa. Esse fato pode ser explicado nos resultados dos autores,

que observaram em solo cultivado, maior velocidade de formação e número de estipes quando comparado ao solo não cultivado, mesmo tipo de solo utilizado no trabalho.

TABELA 2. Número de estipes por escleródios de diferentes massas submetidos ao enterrio ou posicionados na superfície do solo.

Posição do Escleródio	Classes de Massa de Escleródios (g)					
	< 0,01 C1	0,01<0,02 C2	0,02<0,03 C3	0,03<0,04 C4	0,04<0,05 C5	0,05<0,06 C6
	68 dias após a incubação					
Superficial	0,13 Ab	0,38 Ab	0,38 Ab	1,44 Aa	1,25 Aa	1,38 Aa
Enterrado	0,0 Aa	0,0 Ba	0,0 Ba	0,0 Ba	0,50 Ba	0,50 Ba
CV	9,72 %					
	75 dias após a incubação					
Superficial	0,19 Ab	0,75 Ab	0,50 Ab	2,06 Aa	1,94 Aa	2,00 Aa
Enterrado	0,0 Aa	0,0 Ba	0,0 Aa	0,13 Ba	0,63 Ba	0,75 Ba
CV	13,04 %					
	82 dias após a incubação					
Superficial	0,25 Ac	1,00 Ab	0,50 Abc	2,56 Aa	2,50 Aa	2,63 Aa
Enterrado	0,0 Ab	0,38 Bab	0,13 Aab	0,38 Bab	0,75 Bab	0,88 Ba
CV	11,92 %					
	89 dias após a incubação					
Superficial	0,38 Ac	1,00 Ab	0,88 Ab	2,75 Aa	2,63 Aa	2,75 Aa
Enterrado	0,0 Ac	0,38 Bbc	0,38 Bbc	0,63 Bb	1,25 Ba	1,00 Bab
CV	9,15 %					
	96 dias após a incubação					
Superficial	0,38 Ac	1,00 Ab	1,00 Ab	2,88 Aa	2,75 Aa	2,88 Aa
Enterrado	0,0 Ac	0,38 Bbc	0,50 Bbc	0,63 Bb	1,38 Ba	1,25 Ba
CV	9,08 %					

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha ou maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste SNK a 5% de probabilidade.

Os primeiros apotécios foram observados aos 75 DAI, verificando-se sua presença nas classes C4, C5 e C6 e apenas na C5 e C6, para os escleródios colocados na superfície do solo e enterrados, respectivamente (Tabela 3). No final das avaliações constataram-se que os

escleródios da classe C5 e C6 enterrados a 3 cm no solo apresentaram maior quantidade de apotécios comparado às demais classes. Quando os escleródios foram posicionados na superfície do solo, o número de apotécios foi significativamente superior nas classes C4, C5 e C6. Hao et al. (2003) relataram que o número de estipes e apotécios produzidos por *S. sclerotiorum* e *S. minor* foi altamente correlacionado com o tamanho de escleródios. Os autores sugerem que existe um limite de tamanho abaixo do qual os escleródios não produzam apotécios, fato que explicaria, em parte, a rara produção de apotécios em escleródios de *S. minor* na natureza.

TABELA 3. Número de apotécios por escleródios de diferentes massas submetidos ao enterrio ou posicionados na superfície do solo.

Posição do Escleródio	Classes de Massa de Escleródios (g)					
	< 0,01	0,01<0,02	0,02<0,03	0,03<0,04	0,04<0,05	0,05<0,06
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
75 dias após a incubação						
Superficial	0,0 Ab	0,0 Ab	0,0 Ab	0,38 Aa	0,50 Aa	0,44 Aa
Enterrado	0,0 Ab	0,0 Ab	0,0 Ab	0,0 Bb	0,25 Ba	0,25 Ba
CV	4,70 %					
82 dias após a incubação						
Superficial	0,06 Ac	0,25 Abc	0,38 Abc	0,88 Aab	1,25 Aa	1,19 Aa
Enterrado	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,06 Ba	0,63 Ba	0,63 Aa
CV	12,06 %					
89 dias após a incubação						
Superficial	0,25 Ac	0,50 Abc	0,88 Ab	1,88 Aa	1,94 Aa	2,00 Aa
Enterrado	0,0 Ab	0,13 Bb	0,0 Bb	0,25 Bb	0,75 Ba	0,75 Ba
CV	8,76 %					
96 dias após a incubação						
Superficial	0,38 Ac	1,00 Ab	0,88 Ab	2,38 Aa	2,31 Aa	2,50 Aa
Enterrado	0,0 Bc	0,38 Bbc	0,38 Bbc	0,50 Bb	1,00 Ba	1,13 Ba
CV	7,07 %					

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha ou maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste SNK a 5% de probabilidade.

Nota-se que os escleródios de maior massa, dentro de cada localização, apresentaram maior número de apotécios, podendo-se afirmar que o aumento na massa dos escleródios representa maior potencial infectivo às estruturas de resistência de *S. sclerotiorum*. Para Hao et al. (2003) os fragmentos menores de escleródios podem não possuir reservas suficientes para apoiar a produção de apotécios. Enfatiza-se, no entanto, que 100% dos estipes formados nos escleródios da classe C2 e C1 superficial se diferenciaram em apotécios, enquanto nas classes de maiores massas o percentual variou de 72,5 a 90,2%. Este dado nos permite inferir que os escleródios de menor massa, exceção à classe C1 enterrada, podem não apresentar a mesma quantidade de inóculo, todavia, pela diferenciação dos estipes em apotécios, são capazes de liberar ascósporos e também causar doença, representando, deste modo, potencial patogênico às culturas.

Em relação à localização das estruturas de resistência, assim como ocorreu para o número de estipes, foi observada maior diferenciação em apotécios dos escleródios acondicionados sobre o solo. Esse comportamento foi similar em todas as classes de massa, constatando-se em média, 57% mais apotécios nos escleródios posicionados na superfície. Esse fato pode estar associado a maior sensibilidade de escleródios na superfície do solo às condições de clima, pois, para àqueles enterrados, apesar da pouca profundidade, o solo estaria agindo como uma barreira física, reduzindo a luminosidade e a temperatura próxima aos escleródios e atrasando sua germinação e consequentemente a formação de estipes e apotécios.

Ficou evidente que os escleródios localizados na superfície do solo, independente da classe, produziram maior quantidade de propágulos. Esses dados foram verificados em todas as avaliações no decorrer dos períodos de incubação. Considerando-se a maior viabilidade dos escleródios, ao longo do tempo, colocados sobre a superfície do solo (DUNCAN et al., 2006) e que um único apotécio pode produzir, em um período de até dez dias, 2 a 30 milhões de ascósporos (CLARKSON et al., 2003), pode-se inferir que medidas de manejo que promovam o enterrio dos escleródios resultariam em efetiva redução de propágulos do patógeno.

Segundo Görgen et al. (2010), a severidade do mofo branco em diferentes hospedeiros de *S. sclerotiorum* é, em geral, proporcional à densidade de inóculo do patógeno no solo. Todavia, pelos resultados observados no trabalho, torna-se relevante o conhecimento da localização e massa dos escleródios para se fazer tal inferência. O que se pode afirmar é que a redução da população de escleródios e da formação de apotécios é imprescindível, dentre as estratégias de manejo da doença.

3.4 CONCLUSÕES

O enterrio dos escleródios reduz o potencial patogênico de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Escleródios com maior massa e localizados na superfície do solo apresentam maior potencial patogênico, evidenciado pelo maior percentual de germinação carpogênica, número de estipes e apotécios por escleródio.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v.7, n.1, p.1-16, 2006.

BUENO, C. J.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; SOUZA, N. L. Preservação de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathologica**, v.32, n.1, p.42-50, 2006.

CLARKSON, J. P.; STAVELEY, J.; PHELPS, K.; YOUNG, C. S.; WHIPPS, J. M. Ascospore release and survival in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Mycological Research**, v.107, n.2, p.213-222, 2003.

COSTA, G. R.; COSTA, J. L. 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

DUNCAN, R. W.; FERNANDO, W. G. D.; RASHID, K. Y. Time and burial depth influencing the viability and bacterial colonization of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Soil Biology & Biochemistry**, v.38, n.2, p.275-284, 2006.

GÖRGEN, C. A.; CIVARDI, E. A.; RAGAGNIN, V. A.; SILVEIRA NETO, A. N.; CARNEIRO, L. C.; LOBO JUNIOR, M. Redução do inóculo inicial de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja cultivada após uso do sistema Santa Fé. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.10, p.1102-1108, 2010.

HAO, J. J.; SUBBARAO, K. V.; DUNIWAY, J. M. Germination of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* sclerotia under various soil moisture and temperature combinations. **Phytopathology**, v.93, n.4, p.443-450, 2003.

LIANG, Y.; RAHMAN, M. H.; STRELKOV, S. E.; KAV, N. N. V. Developmentally induced changes in the sclerotial proteome of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Biology**, v.114, n.8, p.619-627, 2010.

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.

MUELLER, D. S.; HARTMAN, G. L.; PEDERSEN, W. L. Effect of crop rotation and tillage system on sclerotinia stem rot on soybean. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.24, p.450-456, 2002.

NAPOLEÃO, R.; CAFÉ-FILHO, A. C.; LOPES, C. A.; NASSER, L. C. B.; MAROUELLI, W. A. Efeito da frequência de rega e da umidade do solo sobre a germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.1, p.80-82, 2007.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; GAVA, F.; MOREIRA, É. N.; SACHS, C. Indução da germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes substratos. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.10, n.2, p.145-150, 2011.

REIS, E. M.; TOMAZINI, S. L. Viabilidade de escleróciosde *Sclerotinia sclerotiorum* em duas profundidades no solo. **Summa Phytopathologica**, v.31, n.1, p.97-99, 2005.

TOWNSEND, B. B.; WILLETTS, H. J. The development of sclerotia in certain fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v.37, p.213-221, 1954.

WILLETTS, H. J.; BULLOCK, S. Developmental biology of sclerotia. **Mycological Research**, v.96, n.10, p.801-816, 1992.

WU, B. M.; SUBBARAO, K. V. Effects of soil temperature, moisture, and burial depths on carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor*. **Phytopathology**, v.98, n.10, p.1144-1152, 2008.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sclerotinia sclerotiorum pode infectar as culturas de canola, cártamo, crambe, girassol, nabo forrageiro e níger, no entanto, plantas de nabo forrageiro e canola demonstraram mecanismos de resistência eficientes em resposta à inoculação com o patógeno, com a vantagem de não sofrerem significativas reduções no rendimento das culturas. Em níger também não se verificaram elevados danos provocados pelo patógeno, porém, o fato mais importante observado foi a ausência de escleródios nas plantas infectadas. Nesse sentido, futuras investigações a cerca do assunto deveriam ser desenvolvidas.

Notou-se maior suscetibilidade à *S. sclerotiorum* na cultura do girassol, seguido de cártamo e crambe, proporcionando, consequentemente, relevantes perdas nos caracteres fisiológicos e de rendimento das culturas.

É importante salientar a possibilidade de transmissão do patógeno às sementes de crambe quando inoculadas adotando-se a metodologia com ferimento da planta. A transmissão planta-semente permite a disseminação do patógeno a longas distâncias e sua sobrevivência em contato direto com as sementes, pode resultar na transmissão de *S. sclerotiorum* a nova progênie, como confirmado, por meio de inoculação artificial, às plântulas das culturas de canola, cártamo, crambe, girassol, nabo forrageiro e níger.

A associação de *S. sclerotiorum* com as sementes das culturas propiciou a redução no percentual e velocidade de emergência de cártamo, crambe, girassol, nabo forrageiro e níger, assegurando a introdução do patógeno já nos primeiros estágios de desenvolvimento das plantas.

Foi verificado o desenvolvimento de escleródios nas plantas de girassol, cártamo e crambe em ambos os ensaios experimentais e em canola, apenas no primeiro ensaio. Vale destacar, em plantas de girassol, a formação de escleródios de maior massa, sendo considerados de maior potencial patogênico por apresentarem superior percentual de germinação carpogênica e número de estipes e apotécios por estrutura de resistência.

Considerando-se os resultados do trabalho, pode-se inferir que as culturas de nabo forrageiro, canola e níger apresentam-se como alternativas para a incorporação em sistemas de produção com culturas suscetíveis, como feijão e soja. Enfatiza-se ainda, que o enterrio dos escleródios, pode ser considerado uma estratégia de manejo de *S. sclerotiorum*, visto que a prática possibilita a redução da formação de apotécios pelo patógeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEDENDO, I. P. Podridão de raiz e colo. In: BERGAMIM FILHO, A., KIMATI, H., AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. Cap. 43, p.829-837.

BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.16, n.2, p.93-108, 1994.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v.7, n.1, p.1-16, 2006.

BUENO, C. J.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; SOUZA, N. L. Produção e avaliação da sobrevivência de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.1, p.47-55, 2007.

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

MEYER, M. C. Manejo de *Sclerotinia sclerotiorum* para a sustentabilidade de produção. **Informativo Abrates**, v.21, n.3, p.15, 2011.

OPLINGER, E. S.; OELKE, E. A.; KAMINSKI, A. R.; PUTNAM, D. H.; TEYNOR, T. M.; DOLL, J. D.; KELLING, K. A.; DURGAN, B. R.; NOETZEL, D. M. Crambe. **Alternative Field Crops Manual**, 1991.

PERES, A.; REGNAULTT, Y. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de bary on rootcollar: biology and development of contamination method on sunflower. In: 8º Workshop International *Sclerotinia*, 1993, Toronto. **Abstract...** Toronto: Ontário, 1993. p.1-7.

PERES, J. R. R.; FREITAS JUNIOR, E.; GAZONNI, D. L. Biocombustíveis, uma oportunidade para o agronegócio brasileiro. **Revista de Política Agrícola**, n.1, p.31-41, 2005.

PERVEEN, K.; HASEEB, A.; SHUKLA, P. K. Effect of *Sclerotinia sclerotiorum* on the disease development, growth, oil yield and biochemical changes in plants of *Mentha arvensis*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.17, p.291-294, 2010.

PLÁ, J. V. J. A. Aspectos agronômicos da produção de biodiesel no Brasil. In: 3º CONGRESSO BRASILEIRO – PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 2006, Varginha. **Artigos...** Varginha: UFLA, 2006. p.1-17.

PRATT, R. G.; ROWE, D. E. Differential responses of alfafa genotypes to stem inoculations with *Sclerotinia trifoliorum* and *Sclerotinia Sclerotiorum*. **Plant Disease**, v.75, n.2, p.188-191, 1991.

SARIN, R.; SHARMA, M.; KHAN, A. A. Studies on *Guizotia abyssinica* L. oil: Biodiesel synthesis and process optimization. **Bioresource Technology**, v.100, p.4187-4192, 2009.

TOMM, G. O. Canola: alternativa de renda e benefícios para os cultivos seguintes. **Revista Plantio Direto**, v.15, n.94, p.4-8, 2006.

VARGAS, R. M.; SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.9, n.1, p.199-210, 1998.

VIVAS, M. J. Culturas alternativas – cártamo, sésamo e camelina. **Melhoramento**, v.38, p.183-192, 2002.