

TEMPERATURA, LUMINOSIDADE E MEIO DE CULTURA AFETANDO A PRODUÇÃO DE ESCLERÓCIOS DE *Sclerotium rolfsii* E *Sclerotinia sclerotiorum*

TEMPERATURE, LIGHT AND CULTURE MEDIUM AFFECTING THE PRODUCTION OF SCLEROTIA OF *Sclerotium rolfsii* AND *Sclerotinia sclerotiorum*

Luiz Eduardo B. Blum¹; Alexandre Prada²; Éber Antonio A. Medeiros²; Cassandro V. T. do Amarante¹

RESUMO

Neste estudo avaliou-se as condições ideais para a produção *in vitro* de inóculo de *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Quantificou-se, em placas de petri com meio de cultura artificial, a produção de esclerócios destes fungos sob diferentes regimes de temperatura, luminosidade e meios de cultura. Esta padronização é necessária quando se deseja produzir inóculo puro e em quantidade elevada, para testes de patogenicidade e de resistência de plantas à doenças. Os experimentos foram conduzidos sob condições controladas de laboratório em um delineamento inteiramente casualizado. Nos testes executados verificou-se que *S. rolfsii* desenvolveu-se melhor e produziu mais esclerócios em meio BDA (batata, dextrose, ágar) tradicional, a 27°C e com 24 h de luz branca fluorescente. Todavia, *S. sclerotiorum* produziu mais esclerócios em BDA, a 21°C com ou sem luz. Os meios PEGA (peptona, extrato de levedura, glucose e ágar), NA (nutriente ágar) e FA (fécula ou amido de batata, glucose e ágar) não induziram uma formação significativa de esclerócios.

PALAVRAS-CHAVE: cultivo *in vitro*, fungos formadores de esclerócios, BDA.

SUMMARY

This study evaluated *in vitro* production of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* and *Sclerotinia sclerotiorum* in different culture media, temperatures, and light conditions. This kind of standardization is necessary for the production of pure inoculum, that could be used for tests of pathogenicity and plant resistance to diseases. These experiments were conducted under standard laboratory conditions in a completely randomized experimental design. The results of the trials showed that *S. rolfsii* produced more sclerotia on PDA (potato-dextrose-agar) at 27°C under 24 h of fluorescent white-light. However, *S. sclerotiorum* produced more sclerotia on PDA at 21°C independent of light condition (light or darkness). PEGA (peptona, yeast extract, glucose, agar), NA (nutrient agar), and FA (potato starch, dextrose, agar) media did not induce any production of a significant amount of sclerotia.

KEY WORDS: *in vitro* growth, PDA, sclerotium forming fungi.

1 Engenheiro Agrônomo, Ph. D. – Professor da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC. Centro de Ciências Agroveterinárias. Av. Luiz de Camões, 2090. CEP 88500-000 Lages, SC. E-mail: a2lbb@cav.udesc.br

2 Engenheiro Agrônomo

INTRODUÇÃO

Os fungos *Sclerotium rolfii* Sacc. e *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary são causadores de podridão no caule e murcha em diversas plantas dicotiledôneas e poucas monocotiledôneas de importância econômica. Dentre as plantas hospedeiras, destacam-se o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e a soja (*Glycine max* (L.) Merr.) (BALARDIN, 1992; ECHANDI, 1976; FERREIRA *et al.*, 1979; VIEIRA, 1988). Estes fungos são patógenos que sobrevivem longos períodos no solo e afetam principalmente as raízes e as hastes das plantas. Todavia, as partes mais altas das plantas podem eventualmente ser afetadas. O fungo *S. rolfii* causa importantes doenças, conhecidas como tombamento, murcha de esclerócio ou podridão da haste e *S. sclerotiorum* causa enfermidades conhecidas como mofo branco ou podridão de esclerotinia.

Estes fungos são fitopatógenos que podem sobreviver no solo através de estruturas de resistência conhecidas como esclerócio ou escleródio. O esclerócio é formado por uma massa compactada e melanizada de micélio e, após a sua germinação, é geralmente o responsável inicial pela infecção da planta cultivada. *S. rolfii* produz esclerócio arredondado marrom e *S. sclerotiorum* produz esclerócio irregular preto (VIEIRA, 1988).

O cultivo *in vitro* destes fungos é de grande importância para a sua utilização em trabalhos que exijam inóculo puro e em quantidade pré-determinada. Para isto é necessário se estabelecer as condições de cultivo que permitam o bom desenvolvimento destes organismos. Dentre estas condições estão o meio de cultura, a temperatura e a luminosidade (NWUFO & FAJOLA, 1986). Em geral *S. rolfii* e *S. sclerotiorum* desenvolvem-se bem em BDA (batata, dextrose, ágar). Todavia, informações básicas sobre o crescimento e produção de esclerócios destes fungos em outros meios de cultura são importantes, pois criam mais opções para o cultivo destes fitopatógenos.

Levando em consideração os aspectos

anteriormente comentados, procurou-se avaliar e verificar os meios de cultura, as temperaturas e as condições de luminosidade mais adequadas para o melhor desenvolvimento e para a produção rápida e em maior quantidade de esclerócios de *S. rolfii* e de *S. sclerotiorum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados de *Sclerotium rolfii* (UnB-224 e 886) e de *Sclerotinia sclerotiorum* (UnB-903 e 904) utilizados nos experimentos foram doados pelo Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília, Brasília, DF. Estes isolados foram mantidos em tubos de ensaio com BDA (batata, dextrose, ágar: 200 g de batata; 20 g de dextrose; 15 g de ágar; 1 L de água destilada).

Os seguintes meios de cultura foram testados devido a sua maior disponibilidade: (a) BDA; (b) PEGA (Peptona, extrato de levedura, ágar: peptona 5 g; extrato de levedura 2,5 g; glucose 1 g; água destilada 1 L); (c) NA (Ágar Nutriente: extrato de carne 3 g; K_2HPO_4 2 g; peptona 5 g; KH_2PO_4 0,5 g; ágar 15 g; água destilada 1 L) cuja composição é encontrada em DHINGRA & SINCLAIR (1985); e (d) o meio FA (Fécua ou amido de batata, ágar: fécua de batata 20 g; dextrose 20 g; ágar 20 g; água destilada 1 L).

Os regimes de luz testados foram os de 24h de luz branca fluorescente contínua e 24h de escuro contínuo. O escuro contínuo foi obtido pelo envolvimento das placas de petri com papel aluminizado, que foi retirado apenas na época de contagem dos esclerócios.

Testaram-se as temperaturas de 5°C ($\pm 1^\circ C$), 21°C ($\pm 1^\circ C$) e 27°C ($\pm 1^\circ C$). A temperatura mais baixa foi obtida em refrigerador. As demais temperaturas foram obtidas em sala com ambiente regulado por aquecedor de ar. A temperatura de 5°C foi escolhida por ser a que normalmente se utiliza para armazenar os organismos já desenvolvidos, e as de 21°C e 27°C por serem as temperaturas geralmente encontradas em laboratório.

Em todos os ensaios, um disco de 5 mm de diâmetro, de culturas com 14 dias de idade dos fungos, foi inoculado no centro de placas de petri de vidro (90 mm de diâmetro) contendo 15 ml de meio de cultura. Para os experimentos de luminosidade e temperatura, os fungos foram cultivados em BDA, conforme resultados dos experimentos com meios de cultura. Os testes com meios de cultura e luminosidade foram conduzidos em salas de laboratório com temperaturas de 21°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) e 27°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) para *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*, respectivamente.

Aos 10 e 15 dias após o início do cultivo dos patógenos, computaram-se somente os esclerócios maduros, i.e., marrons e pretos para *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum*, respectivamente. Posteriormente, as placas com esclerócios de *S. sclerotiorum* foram mantidas por 30 dias a 10-15°C sob luz contínua para avaliação da germinação carpogênica.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições. Após verificada a significância dos dados através da Análise de Variância (Teste F, 5%) as médias dos tratamentos foram comparadas entre si através do teste de Tukey (P = 5%).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro passo rumo ao sucesso em estudos envolvendo microrganismos é o conhecimento detalhado sobre o seu desenvolvimento em meios de cultura. Informações sobre as opções ambientais para o seu cultivo e produção de estruturas reprodutivas também são essenciais.

Neste estudo, verificou-se que o meio de cultura que mais favoreceu a produção esclerócios, tanto de *Sclerotium rolfsii* quanto de *Sclerotinia sclerotiorum*, foi o BDA (Tabela 1). Este meio, por possuir mais carboidratos (dextrose e amido) que os demais, provavelmente colaborou para o melhor desenvolvimento e para a maior formação de esclerócios, em menor espaço de tempo. Outros autores (ITO *et al.*, 1990; SILVA e MACHADO, 1989) utilizaram o BDA para isolamento e cultivo destes fungos,

com sucesso, porém, não fizeram alusão alguma aos fatores do meio de cultura que favoreciam a produção de esclerócios. FERRAZ & CAFÉ FILHIO (1998) mostraram que se o objetivo é a produção de esclerócios, meios de cultura ricos em carboidratos, como o BDA, devem ser usados. O meio com fécula de batata (amido) não apresentou os resultados satisfatórios esperados. Este meio poderia ser uma opção ao tradicional BDA. Obviamente, diferentes quantidades dos nutrientes deste meio (FA) deveriam ser testadas e talvez os resultados fossem mais promissores. BAKR (1989) relatou que o crescimento micelial e a formação de esclerócios de *S. sclerotiorum* foram favorecidos pela glucose como fonte de carbono e desfavorecidos pela celulose, lactose e maltose.

Observa-se que a temperatura de 27°C favoreceu a formação de esclerócios de *S. rolfsii*, e a de 21°C a formação de esclerócios de *S. sclerotiorum* (Tabela 2). NWUFO & FAJOLA (1986) verificaram que a temperatura que mais favoreceu o desenvolvimento de *S. rolfsii* foi 30°C, aproximando-se aos resultados aqui relatados. SILVA & MACHADO (1989) utilizaram a temperatura de 20°C para incubar mudas com *S. sclerotiorum*, por verificarem que nesta temperatura o fungo seria favorecido. Nossos resultados reforçam experimentalmente que a formação de esclerócios e o crescimento de *S. sclerotiorum* foram favorecidos pelo cultivo a 21°C.

A Tabela 3 mostra que *S. rolfsii* produz mais esclerócios na presença da luz, enquanto que *S. sclerotiorum* não apresentou diferenças na produção de esclerócios em cultivos com ou sem luz. NWUFO & FAJOLA (1986) observaram que *S. rolfsii* produz mais esclerócios na presença de luz. A luz é essencial não só para a formação dos esclerócios, mas também para a melanização da camada exterior dos mesmos. Portanto, o cultivo na presença de luz seria desejável.

A germinação carpogênica dos esclerócios de *S. sclerotiorum* foi avaliada (Figura 1), porém, houve baixa produção de apotécios. Embora não havendo diferenças significativas, somente esclerócios oriundos de

Tabela 1. Efeito do meio de cultura na produção de esclerócios por isolados de *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Médias relativas a quatro repetições.

Meio	Número médio de esclerócios / placa de petri							
	<i>Sclerotium rolfsii</i>				<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>			
	10 dias		15 dias		10 dias		15 dias	
	UnB 224	UnB 886	UnB 224	UnB 886	UnB 903	UnB 904	UnB 903	UnB 904
BDA	321,0	235,0	383,3	283,3	15,5	14,8	18,0	16,5
PEGA	0,0	0,0	175,5	84,8	8,8	0,0	10,3	0,0
NA	0,0	0,0	118,3	18,3	0,0	2,3	4,8	3,0
FA	0,0	0,3	7,3	8,8	0,0	0,0	0,0	0,0
F_{calculado}	15,4	13,3	14,2	29,9	14,5	NS	13,0	NS
DMS	171,8	135,2	175,9	98,0	8,3	--	9,0	--

DMS = Diferença mínima significativa (Teste de Tukey, 5%).

NS = Diferença não significativa (Teste F, 5 %).

Tabela 2. Efeito da temperatura na produção *in vitro* de esclerócios de *Sclerotium rolfsii*/UnB-866 e *Sclerotinia sclerotiorum* / UnB-904. Médias relativas a quatro repetições.

Temperatura	Número médio de esclerócios / placa de petri			
	<i>Sclerotium rolfsii</i>		<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	
	10 dias	15 dias	10 dias	15 dias
5°C	0,0	0,0	0,0	0,0
21°C	0,0	113,0	6,0	9,0
27°C	197,0	275,8	2,5	9,3
F_{calculado}	52,2	241,5	NS	23,4
DMS	62,2	35,2	--	4,3

DMS = Diferença mínima significativa (Teste de Tukey, 5%).

NS = Diferença não significativa (Teste F, 5 %).

Tabela 3. Efeito da luz na produção *in vitro* de esclerócios de *Sclerotium rolfsii* / UnB-866 e *Sclerotinia sclerotiorum* / UnB-904. Médias relativas a quatro repetições.

Luz (horas)	Número médio de esclerócios / placa de petri			
	<i>Sclerotium rolfsii</i>		<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	
	10 dias	15 dias	10 dias	15 dias
0	255,3	302,5	4,3	11,0
24	358,3	386,8	4,5	13,5
F calculado	7,2	12,9	NS	NS
DMS	94,1	57,3	--	--

DMS = Diferença mínima significativa (Teste de Tukey, 5%).

NS = Diferença não significativa pelo (Teste F, 5 %).

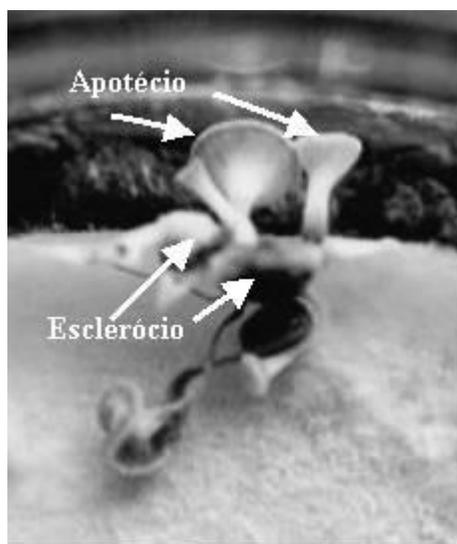


Figura 1. Apotécios originados da germinação de esclerócios de *Sclerotinia sclerotiorum*.

placas previamente cultivadas a 21°C formaram apotécio. HUANG & KOZUB (1991) relataram que a manutenção de esclerócios de *S. sclerotiorum* a 10°C favoreceu a germinação carpogênica dos mesmos. Outro fator importante na produção de apotécios é a intensidade luminosa. Esclerócios submetidos a alta intensidade luminosa desenvolveram apotécios em poucos dias, ao contrário, várias semanas foram necessárias para a germinação destes esclerócios quando a intensidade luminosa foi baixa (SUN & YANG, 2000). A interação entre temperatura e luminosidade interfere na produção de apotécios. SUN & YANG (2000) mostraram que o ótimo de temperatura para a produção de apotécios de *S. sclerotiorum* sob baixa intensidade luminosa foi de 12 a 18°C. Todavia, estes autores mostraram que o ótimo foi de 20°C quando a intensidade luminosa foi alta.

Pelos resultados aqui apresentados, podemos concluir que a formação de esclerócios de *S. rolfisii* em meio de cultura, é favorecida em BDA, a 27°C e pela luz. Já *S. sclerotiorum* tem sua formação de esclerócios favorecida por temperatura ao redor de 21°C, em BDA, sem ser afetada significativamente pela luminosidade. Este tipo de estudo, embora básico e simples, nos fornece informações que facilitam sobremaneira a produção de inóculo puro e em quantidades necessárias para a inoculação artificial de plantas em trabalhos de seleção visando a resistência e em testes de patogenicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKR, M. A. Growth and sclerotia formation of *Sclerotinia sclerotiorum* on different carbon sources. **Bangladesh Journal of Plant Pathology**, v. 5, n. 1-2, p. 81-83, 1989.
- BALARDIN, R. S. Doenças do feijoeiro. In: EPAGRI. **A cultura do feijão em Santa Catarina**. Florianópolis: EPAGRI, 1992. p. 195-225.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1985. 355 p.
- ECHANDI, E. Principales enfermedades de hongo del frijol (*Phaseolus vulgaris*) en tropicos americanos en diferentes zonas ecológicas. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 1, n. 3, p. 171-177, 1976.
- FERRAZ, L. C. L.; CAFÉ FILHO, A. C. Meios de cultura e fatores culturais para produção de escleródios e apotécios de *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 3, p. 364-369, 1998.
- FERREIRA, L. P.; LEHMAN, P. S.; ALMEIDA, A. M. R. **Doenças da soja no Brasil**. Londrina, Paraná: EMBRAPA-CNPSoja. Londrina, 1979. 42p.
- HUANG, H. C.; KOZUB, G. C. Temperature requirements for carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates of different geographic origin. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 32, n. 4, p. 279-286, 1991.
- ITO, M. F.; WUTKE, E. B.; MARTINS, A. L. M. Ocorrência de *Sclerotium rolfisii* em Guandu (*Cajanus cajan*). **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 15, n. 3, p. 231-234, 1990.
- NWUFO, M. F.; FAJOLA, A. O. Cultural studies on *Botryodiplodia theobromae* and *Sclerotium rolfisii* causing storage rots of cocoyam (*Colocasia esculenta*). **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 11, n. 3, p. 443-454, 1986.
- SILVA, S. M.; MACHADO, J. C. Metodologia de inoculação e comportamento de algumas cultivares de soja (*Glycine max* L.), em relação à *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 14, n. 2, p. 118, jul. 1989.
- SUN, P.; YANG, X. B. Light, temperature, and moisture effects on apothecium production of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 84, n. 12, p. 1287-1293, 2000.
- VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa:UFV/Imprensa Universitária, 1988. 231p.