



XLI Congresso Paulista de Fitopatologia

20 a 22 de fevereiro de 2018
Marília - SP

INDUTORES DE GERMINAÇÃO DE ESCLERÓDIOS DE *Sclerotium cepivorum*

L. B. DOMINGOS¹, E. A. LOPES¹, L. E. VISOTTO¹, P. I. V. G. GOD¹, L. M. PINHEIRO¹

¹Universidade Federal de Viçosa *Campus* Rio Paranaíba, Instituto de Ciências Agrárias, Rio Paranaíba-MG. lu.basstos@gmail.com, everaldolopes@ufv.br, lvisotto@ufv.br, pedro.god@ufv.br, leticia.pinheiro@ufv.br

RESUMO - Indutores de germinação de escleródios podem ser utilizados em áreas infestadas com *Sclerotium cepivorum* e reduzir o inóculo do fungo no campo. O presente trabalho teve como objetivo avaliar quatro diferentes tipos de indutores de germinação de escleródios de *S. cepivorum*. Extrato aquoso e etanólico de alho preparados em laboratório (20%, m:v), água residual de agroindústria de alho e extrato aquoso produzido pela Shimada Agronegócios (20%, m:m) foram utilizados como indutores de germinação a 17 e 27 °C em laboratório. Além disso, a ação de dialil dissulfeto (DADS) como estimulante de germinação foi avaliada usando tubos plásticos com solo e contendo escleródios enterrados a 10, 20 e 30 cm de profundidade. Todos os extratos de alho induziram a germinação dos escleródios, independentemente da temperatura avaliada. DADS induziu a germinação de escleródios de 10 a 30 cm de profundidade, com maior efeito sobre escleródios localizados a 10 cm.

Palavras-chave: podridão branca, escleródio, *Stromatinia cepivora*, extratos, dialil dissulfeto.

INTRODUÇÃO

A podridão branca, causada por *Sclerotium cepivorum*, limita a produção de alho e cebola em áreas infestadas (Stewart & McLean, 2007). Esse fungo possui crescimento micelial esbranquiçado e produz pequenos escleródios pretos, que são suas estruturas de resistência. Entre os principais sintomas da doença estão o amarelecimento da parte aérea das plantas, seguido da morte das folhas afetadas, morte das raízes e apodrecimento dos bulbos, que se tornam amolecidos e infestados de micélio e escleródios. As plantas são facilmente arrancadas do solo, devido à deterioração do sistema radicular.

A doença é de difícil manejo. A aplicação de fungicidas tem limitada eficiência, já que os ingredientes ativos não conseguem atuar na maior parte dos escleródios encontrados no solo e por não protegerem os locais de infecção nas raízes. Além disso, as moléculas podem ser rapidamente degradadas no solo (Zewide et al., 2007). Outra limitação do controle é o fato de que os escleródios podem persistir viáveis no solo por até 30 anos, o que inviabiliza a adoção da rotação de culturas. Assim, diferentes estratégias de manejo devem ser adotadas



XLI Congresso Paulista de Fitopatologia

20 a 22 de fevereiro de 2018

Marília - SP

para redução da população do fungo no campo, incluindo solarização, biofumigação, controle biológico, controle químico e a aplicação de indutores de germinação. A aplicação de extratos de alho ou compostos sintéticos que mimetizam as substâncias liberadas pelas raízes de espécies de *Allium* induzem a germinação de escleródios do fungo quando o solo está úmido e a temperatura situa-se entre 13 e 18°C. Na ausência de hospedeiros, os escleródios germinados morrem quando suas reservas nutricionais acabam e as hifas são mais suscetíveis ao ataque de antagonistas. Assim, a aplicação de indutores de germinação pode reduzir a população de escleródios viáveis no solo e ser uma importante estratégia a ser integrada no manejo da doença. Avaliou-se neste trabalho o potencial de extrato aquoso de alho, preparado em laboratório ou por produtores de alho, extrato etanólico de alho preparado em laboratório e efluente de fábrica de tempero de alho como indutores de germinação de escleródios de *S. cepivorum* em meio de cultura. Além disso, a ação do dialil dissulfato sintético (DADS) foi estudado como estimulante de germinação em microcosmo, simulando distintas profundidades do inóculo e aplicação de lâminas de irrigação.

MATERIAL E MÉTODOS

O isolado de *Sclerotium cepivorum* foi obtido de plantas de alho infectadas em campo. Os escleródios foram retirados destas plantas e desinfestados em álcool 50% por 30 segundos e, posteriormente, em hipoclorito de sódio 0,5% por 180 segundos. Em seguida, foram enxaguados duas vezes em água destilada estéril e transferidos para placas de Petri com meio de cultura batata dextrose ágar (BDA), enriquecidos com extrato de alho aquoso a 20% (m:m). As placas de Petri foram mantidas a 17 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 horas, por 15 dias.

Para a produção dos extratos de alho, bulbilhos foram descascados, lavados em água corrente e desinfestados em hipoclorito de sódio 1,0% durante cinco minutos. Os bulbilhos foram transferidos para liquidificador com álcool 96%, para o preparo do extrato etanólico, na proporção de 20% (m:m), ou com água destilada estéril para o preparo de extrato aquoso, também a 20% (m:v). Os bulbilhos foram triturados por um minuto e os extratos foram mantidos em repouso por três dias. Os extratos foram filtrados em papel filtro de poros de 14 µm e gramatura de 80 g.m⁻² e armazenados a 4 °C em vidros vedados de coloração âmbar. Também foi utilizado efluente de fábrica de tempero de alho do Sul de Minas Gerais, constituído do resíduo da lavagem e da maceração de bulbilhos de alho em água; além de



XLI Congresso Paulista de Fitopatologia

20 a 22 de fevereiro de 2018

Marília - SP

extrato aquoso produzido na fazenda comercial Shimada Agronegócios (Campos Altos, MG), com concentração de 20% (m:m).

Os extratos foram adicionados em meio ágar-ágar a 45 °C, juntamente com antibiótico sulfato de estreptomicina (500 mg.L⁻¹). Em seguida, o meio de cultura foi distribuído em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Depois da solidificação, foi adicionado um escleródio no centro de cada placa. Os escleródios foram obtidos de cultura pura com 15 dias de idade. As placas foram incubadas em BOD, com fotoperíodo de 12 horas a 17 ± 2 °C e 27 ± 2 °C por 25 dias. A avaliação começou a partir da formação de novos escleródios, que foi feita com auxílio de microscópios estereoscópico. Placas testemunhas continham apenas ágar-ágar.

Para o teste de viabilidade dos escleródios formados a partir da germinação induzida pelos extratos, foram transferidos com auxílio de pinça, quatro escleródios para placas de Petri contendo BDA e enriquecidas dos extratos mencionados acima, os escleródios foram posicionados de forma equidistante. As placas foram armazenadas em BOD a 17 ± 2 °C e a testemunha continha somente água. Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar sob condições assépticas.

Para avaliar a ação do DADS na germinação dos escleródios de *S. cepivorum*, e conseqüentemente sua percolação no perfil do solo, foram preenchidos tubos de PVC de 30 cm de altura e 10 cm de diâmetro com solo autoclavado (121 °C por 120 minutos), de textura média e coletado em área não infestada com o patógeno. Bolsas de poliéster com 75 cm², com fibras internas de 0,04 mm², foram preenchidas com dez escleródios (previamente desinfestados em NaCl a 0,5% por um minuto e lavados três vezes com água estéril) e colocadas nos tubos a 10, 20 e 30 cm de profundidade. Uma bolsa foi colocada em cada profundidade e o local demarcado na face externa do tubo.

Foram feitas simulações de duas lâminas de irrigação, 3 e 5 mm, com calda de 10 L de DADS para 1.000 L de água. Apenas água foi aplicada nas testemunhas. Os tubos foram mantidos em BOD por 40 dias a 17 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. Depois deste período, as bolsas foram retiradas e os escleródios em foram avaliados com auxílio de microscópio trinocular com objetivas invertidas. Os escleródios foram classificados em chochos (vazios, com casca rompida e sem micélio no interior), intactos (sem emissão de tubo germinativo e casca sem fissuras), germinando (hifas saindo de um único ponto da casca) e germinação ativa (tubo germinativo e micélio aparente em mais de um ponto da casca).

Os experimentos foram realizados duas vezes. Os dados obtidos foram submetidos a testes de normalidade de variâncias e homocedasticidade dos erros, seguidos de análise de



XLI Congresso Paulista de Fitopatologia

20 a 22 de fevereiro de 2018

Marília - SP

variância ($p < 0,05$) e teste de Tukey ($p < 0,05$), com uso do pacote estatístico Assisat 7.7 (Silva, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os quatro extratos induziram a germinação dos escleródios, tanto a 17 °C quanto a 27 °C (Figura 1). Este resultado demonstra que escleródios de *S. cepivorum*, podem crescer fora da faixa de temperatura adequada 10 a 20 °C, formando um número inferior de escleródios, frente ao crescimento induzido em faixa ótima. Levando em consideração que os escleródios mantidos a 27 °C foram formados a partir de cultura pura e armazenados em temperaturas abaixo de 20 °C, acredita-se que eles já teriam iniciado o processo de germinação antes de serem plaqueados e, por isso, ao serem replaqueados em meio enriquecido com os extratos, mantiveram o seu desenvolvimento micelial, culminando com a formação de novos escleródios. Maior número de escleródios foram formados em meio com extrato etanólico de alho, quando o fungo foi incubado a 17 °C, que está dentro da faixa ótima de crescimento.

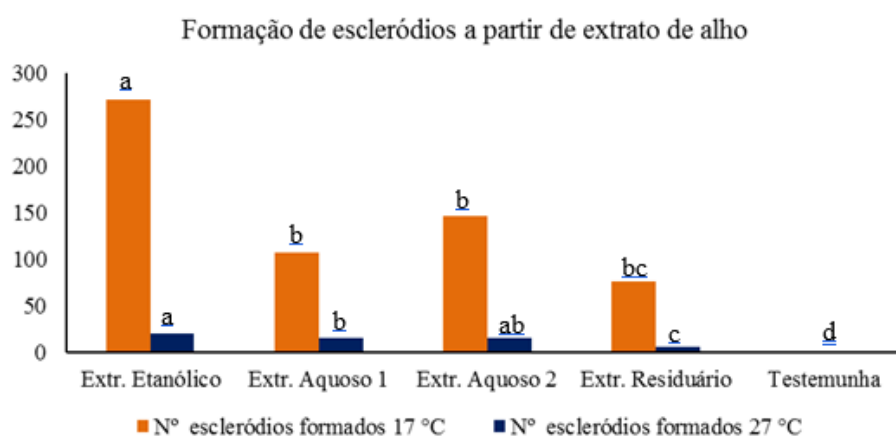


Figura 1. Número de escleródios de *Sclerotium cepivorum* formados a 17 °C e 27 °C após cultivo em ágar-ágar enriquecido com extrato etanólico de alho (20%, m:v), extrato aquoso de alho (20%, m:v) produzido em laboratório (Extr. aquoso 1) ou em fazenda comercial (Extr. Aquoso 2); extrato residuíário (Rejeito de fábrica de tempero de alho). Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os escleródios secundários, provenientes das culturas induzidas à germinação, estavam viáveis, independentemente do tipo de extrato incorporado ao meio de cultura, com germinação média de 75% dos escleródios incubados a 17 °C e 50% dos incubados a 27 °C. A



XLI Congresso Paulista de Fitopatologia

20 a 22 de fevereiro de 2018

Marília - SP

viabilidade dos escleródios pode estar relacionada com a superação da latência constitutiva dos inóculos. Mais estudos relacionados à formação e à viabilidade de escleródios secundários devem ser realizados, para que se entenda se essa produção ocorre apenas em função das reservas contidas no escleródio primário e se essa produção é um fator significativo para reposição de populações de escleródios no solo quando estes são estimulados por indutores de germinação por mais de um ciclo de estímulo.

A aplicação de DADS estimulou a germinação dos escleródios em todas as profundidades, sendo mais eficiente a 10 cm e menos eficiente a 30 cm (Tabela 1). Sem a aplicação de DADS, a germinação variou de 24 a 28%. Em condições de solo úmido, os compostos voláteis estimulantes da germinação atingiram os escleródios até a profundidade de 30 cm (Crowe & Hall, 1980). A eficiência do DADS na indução da germinação depende da profundidade e também da densidade de inóculo (Hovius & McDonald, 2002). Em solos altamente infestados, outras medidas devem ser adotadas antes da utilização do DADS, visando à redução do inóculo.

Tabela 1. Porcentagem de escleródios de *Sclerotium cepivorum* germinados em tubos de PVC em diferentes profundidades de avaliação com e sem aplicação de dialil dissulfeto após 40 dias de incubação.

Tipo de Aplicação	Profundidade dos escleródios no perfil do solo (cm)		
	10	20	30
Com DADS	90 aA ⁽¹⁾	69 aB	35 aC
Sem DADS	28 bA	28 bA	24 bA

⁽¹⁾Médias seguidas por letras maiúsculas na linha e letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

CONCLUSÃO

Escleródios germinam na presença de extratos aquosos e etanólicos de alho (20% m:v) e de efluente de agroindústria de alho em temperaturas de 17 e 20°C. A aplicação de DADS estimula a germinação de escleródios de *Sclerotium cepivorum* a 10, 20 e 30 cm de profundidade, especialmente nos escleródios localizados mais próximos da superfície do solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



XLI Congresso Paulista de Fitopatologia
20 a 22 de fevereiro de 2018
Marília - SP

CROWE, F.J.; HALL, D.H. Soil temperature and moisture effects on sclerotium germination and infection of onion seedlings by *Sclerotium cepivorum*. *Phytopathology*, v.70, p.74-80, 1980.

HOVIUS, M.H.Y.; McDONALD M.R. Management of *Allium* white rot (*Sclerotium cepivorum*) in onions on organic soil with soil-applied diallyl disulphide and di-N-propyl disulphide. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v.24, p.281-286, 2002.

STEWART, A.; McLEAN, K.L. Biological control of onion white rot. In: CHINCHOLKAR, S.B.; MUKERJI, K.G. (Ed.). *Biological Control of Plant Diseases*. New York: The Haworth Press, p.123-148, 2007.

ZEWIDE, T.; FININSA, C.; SAKHUJA, P.K. Management of white rot (*Sclerotium cepivorum*) of garlic using fungicides in Ethiopia. *Crop Protection*, v.26, n.6, p.856-866, 2007.