

**Produção *in vitro* de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes regimes de luz***In vitro* production of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* under different light regimesFabíola Teodoro Pereira<sup>1</sup>; Marina Gabriela Marques<sup>1</sup>; Daniel Diego Costa Carvalho<sup>1,2</sup>

1 – Universidade Estadual de Goiás, Laboratório de Fitopatologia, Ipameri, GO

2 – Autor para correspondência (*Author for correspondence*): daniel.carvalho@ueg.br**RESUMO**

A produção *in vitro* de inóculo de fungos é requerida em muitos estudos sobre epidemiologia e controle de fitopatógenos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção *in vitro* de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* em dois regimes de luz. Para a obtenção de escleródios, discos de ágar contendo micélio de *S. sclerotiorum* (L-21-01) foram transferidos para frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo arroz parbolizado (15 g/frasco). Em seguida, os Erlenmeyer (5 frascos por regime de luz) foram mantidos por oito dias a 25°C e submetidos a dois regimes de luz (0 e 12 horas de luz). Após este período, o meio sólido contendo os escleródios formados *in vitro* foi removido para separação manual dos escleródios obtidos. Após 30 dias de exposição em bancada para secagem natural até peso constante, foram quantificados o número total, a massa de escleródios formados por Erlenmeyer e a massa de uma unidade produzida. O isolado L-21-01 foi indiferente quanto ao regime de luz para a produção *in vitro* de escleródios (unidades). O regime de 12 h de luz proporciona maior massa total e individual de escleródios, quando comparado ao regime de 0 h de luz.

**Palavras-chave:** fisiologia de fungos, mofo branco, produção massal.**ABSTRACT**

*In vitro* production of fungal inoculum is request in many studies about the epidemiology and control of plant pathogens. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* production of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* under two light regimes. Aiming to obtain sclerotia, agar plugs containing mycelium of *S. sclerotiorum* (L-21-01) were transferred to Erlenmeyer flasks (250 mL) containing parboiled rice (15 g per flask). Then, the Erlenmeyer (5 flasks per light regime) were maintained during eight days at 25°C and subjected to two light regimes (0 and 12 hours of light). After this period, the solid medium containing the sclerotia formed *in vitro* were removed for manual separation of the obtained sclerotia. After 30 days of exposure on bench for natural drying until constant weight, it were quantified the total number, the sclerotia mass formed by Erlenmeyer and the mass of a produced unit. The isolated L-21-01 was indifferent to the light regime for *in vitro* production of sclerotia (units). The regime of 12 h light, provides higher total and individual mass of sclerotia when compared to the regime of 0 h light.

**Key-words:** fungal physiology, white mold, mass production.

## INTRODUÇÃO

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, agente causal do mofo branco em diversas culturas, se encontra disseminado em áreas do Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil, principalmente em regiões de climas temperados e úmidos (Juliatti et al., 2013). Existem 1915 registros de ocorrência de *S. sclerotiorum* em diversos hospedeiros no mundo, sendo 53 em *Phaseolus vulgaris* L. (Farr & Rossman, 2015). Em condições climáticas favoráveis, este fungo apresenta o desenvolvimento de um micélio branco com aspecto cotonoso, podendo causar lesões por toda parte da planta, tais como caule, haste, folhas e vagens, dificultando o controle do mofo branco nas culturas atacadas (Amoozadeh et al., 2015; Du et al., 2014). Como consequência, ocorre durante o processo infectivo a produção de grande quantidade de escleródios, que são as estruturas de resistência do patógeno formado pelo adensamento de hifas (Agrios, 2005).

Muitos são os trabalhos que dependem de produção de inoculo do patógeno-alvo para avaliar a virulência de isolados (Carvalho et al., 2008) ou mesmo reproduzir os sintomas da doença em testes visando seu controle (Carvalho et al., 2014), uma vez que muitos patógenos não estão disponíveis na natureza durante o ano todo. Assim, invariavelmente, torna-se necessária a produção *in vitro* de inoculo de patógenos. Entretanto, muitos são os fatores que interferem nesta produção de inoculo, tais como fatores físicos (água, luz e nutrientes) ou adição ao meio de cultura de componentes sintéticos específicos para favorecer crescimento (Gorgen et al., 2010; Ponmurugan et al., 2010). Escleródios de *S. sclerotiorum* são abundantes apenas nas estações chuvosas ou quando a cultura é conduzida sob sistema de irrigação (Geraldine et al., 2013). Assim, fora dessas épocas ou condições, é difícil a obtenção de estruturas de resistência deste fungo, o que inviabiliza pesquisas com escleródios, quando se almeja usá-los para testes com fungicidas, por exemplo (Vrisman et al., 2014).

A produção artificial de escleródios de *S. sclerotiorum* requer técnicas especiais (Ferraz & Café Filho, 1998) e, além disso, a produção em larga escala no laboratório é necessária para realização de trabalhos envolvendo *S. sclerotiorum*, onde métodos eficientes e práticos devem ser desenvolvidos para a obtenção *in vitro* de escleródios (Garcia et al., 2012). Assim, como parte de um projeto almejando realizar vários estudos com este fungo (Carvalho et al., 2015),

## OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção *in vitro* de escleródios de *S. sclerotiorum* em dois diferentes regimes de luz.

## MATERIAL E MÉTODOS

O isolado L-21-01 foi obtido a partir de escleródios removidos de plantio de feijão Pérola em área experimental da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Ipameri.

Para o isolamento, os escleródios colhidos no campo foram encaminhados para o Laboratório de Fitopatologia da UEG e, semeados em placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA). Após sete dias de cultivo, uma placa exibindo micélio de *S. sclerotiorum* foi selecionada para subseqüentes repicagens até obtenção do isolado purificado em 07-05-14. Para a obtenção de escleródios, discos de ágar (5 mm de diâmetro) retirados de culturas do isolado L-21-01, com sete dias de cultivo, foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidade (6 discos/frasco), contendo arroz parbolizado (15 g/frasco), previamente umedecido (60% p v<sup>-1</sup>) e autoclavado (121° C; 40 min) (Carvalho et al., 2011). Os frascos foram mantidos em incubadora BOD a 25° C e submetidos a dois regimes de luz (a) fotoperíodo de 0 hora e (b) 12 horas de luz. Após oito dias de incubação, a massa de arroz colonizada foi retirada. A remoção dos escleródios formados foi realizada em água corrente. Após completa

remoção, os escleródios foram deixados em bancada por 10 dias para secagem natural e, logo após, foram quantificados o número total e a massa (mg) de escleródios formados em 15 g de arroz parbolizado, além da massa média (mg) de um escleródio.

Os experimentos foram realizados duas vezes, contando com 5 repetições (Erlenmeyer) para cada regime de luz avaliado. Todos os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para checar a normalidade. Em seguida, os resultados relativos à produção *in vitro* de escleródios foram submetidos ao teste de t ( $P \leq 0,05$ ), com auxílio do programa SISVAR 5.3 (Ferreira, 2011).

**Tabela 1.** Produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (L-21-01) submetidos a 0 h e 12 h de luz fluorescente.

**Table 1.** Production of *Sclerotinia sclerotiorum* (L-21-01) sclerotia under 0 h and 12 h of fluorescent light

Regime de Luz	Número de escleródios	Massa (mg) de escleródios	Massa (mg) de um escleródio
0 hora de luz	117,0 a*	1595,0 b	13,1 b
12 horas de luz	159,8 a	2672,0 a	16,9 a
Coeficiente de Variação (%)	27,70	25,64	12,05

\* = Valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste de t ( $P \leq 0,05$ )

De forma oposta, Serra e Silva (2005) obtiveram maior produção de escleródios de *Sclerotium rolfisii* (isolado SR3) em meio sólido batata-dextrose-ágar (BDA) no regime de 12 h de luz (a 25°C) (844 escleródios por placa de Petri) em comparação ao regime de ausência de luz (525 escleródios por placa de Petri). Eventual diferença nos resultados encontrados na Tabela 1 em comparação a Serra e Silva (2005) pode ser explicada pelo fato de o experimento com *S. rolfisii* ter sido conduzido em placas de Petri, as quais possuem proporcionalmente grande área superficial, ocorrendo maior penetração de luz nas colônias fúngicas em comparação com Erlenmeyer, onde a penetração de luz em seu interior é menor. Em caso de igualdade no número escleródios produzidos em meio sólido, quando em diferentes regimes de luz, sugere-se optar pela produção no escuro, pois o fungo *S. sclerotiorum* não tem o crescimento micelial alterado (Tabela 1), além de que a ausência de luz dificulta o desenvolvimento de

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação ao número de escleródios de L-21-01 produzidos em 15 g de meio sólido (arroz parbolizado), não houve diferença entre os regimes de luz (Tabela 1). Com relação a massa de escleródios produzidos, a maior produção total foi verificada no regime de 12 h de luz (2672,0 mg) em comparação com o regime de 0 h de luz (1595,0 mg). De forma análoga, a massa média de um (1) escleródio produzido no regime de 12 h de luz foi estatisticamente maior (16,9 mg) do que no regime de 0 h de luz (13,1 mg).

eventuais microrganismos contaminantes (Napoleão et al., 2006).

Com relação a massa de escleródios produzidos em meio sólido, maior produção total foi verificada no regime de 12 h de luz em comparação com o regime de 0 h de luz. De forma análoga, ao estudar outro fungo do filo Ascomycota, Teramoto et al. (2013), verificaram que maioria dos isolados de *Corynespora cassiicola* (71% de 14 isolados avaliados) não apresentaram maior crescimento de micélio quando submetidos ao escuro. O que se conhece sobre a influência de luz é que este fator físico estimula a esporulação de alguns fungos Hyphomycetes (Teixeira et al., 2002). Entretanto, não existem informações suficientes sobre estudos para produção de conídios *in vitro* (Carvalho et al., 2008) e nem mesmo produção de estruturas de resistência de fungos. O que se pode inferir sobre a produção de escleródios é que esta é dependente da produção abundante de micélio,

uma vez que os escleródios de *S. sclerotiorum* se originam do adensamento de hifas (Agris, 2005).

A maior produção de massa total de escleródios quando em 12 h de luz, adicionado à produção de igual número de escleródios nos dois regimes, é considerada como a causa para o fato de a massa individual de um (1) escleródio produzido em sob 12 h de luz ter sido maior do que no regime de 0 h de luz. Tal fato é extremamente importante para estudos epidemiológicos, onde que a obtenção de escleródios maiores e, conseqüentemente, possuidores de maior massa, possuem maior germinação carpogênica quando comparado com escleródios menores (Venturoso et al., 2014). Assim, visando à obtenção de escleródios maiores, os resultados da Tabela 1 sugerem o cultivo de *S. sclerotiorum* sob fotoperíodo de 12 h.

Enfim, o fotoperíodo é de extrema importância não só para o desenvolvimento de metodologias visando à produção massal *in vitro* de escleródios de *S. sclerotiorum*, como também em estudos de campo, pois a luz pode influenciar maior produção de micélio do fungo sobre as plantas, potencializando as atividades relacionadas a patogênese (Gomes, 2013) e favorecendo a germinação carpogênica (Venturoso et al., 2014; Silva et al., 2011).

## CONCLUSÃO

A maior produção de massa total de escleródios quando em 12 h de luz, adicionado à produção de igual número de escleródios nos dois regimes, proporciona produção de escleródios maiores, os quais são recomendados para realização de experimentos que requerem maior germinação carpogênica.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por duas bolsas de iniciação científica e ao Programa de Bolsa de Incentivo à Pesquisa e Produção Científica (PROBIP) da

Universidade Estadual de Goiás (UEG) por uma bolsa de produtividade em pesquisa.

## REFERÊNCIAS

AGRIS, G. N. 2005. **Plant Pathology**. 5<sup>ed</sup> Oxford, UK: Academic Press Publications, 922.

AMOOZADEH, M.; DARVISHZADEH, R.; DAVAR, R.; MANDOULAKANI, B. A.; HADDADI, P.; BASIRNIA, A. 2015. Quantitative trait loci associated with isolate specific and isolate non-specific partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower. **Journal of Agricultural Science and Technology**, 17: 213-226.

CARVALHO, D. D. C.; ALVES, E.; BATISTA, T. R. S.; CAMARGOS, R. B.; LOPES, E. A. G. L. 2008. Comparison of methodologies for conidia production by *Alternaria alternata* from citrus. **Journal of Microbiology**, 39: 792-798.

CARVALHO, D. D. C.; GERALDINE, A. M.; LOBO JUNIOR, M.; MELLO, S. C. M. 2015. Biological control of white mold by *Trichoderma harzianum* in common bean under field conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 50: 1220-1224.

CARVALHO, D. D. C.; LOBO JUNIOR, M.; MARTINS, I.; INGLIS, P. W.; MELLO, S. C. M. 2014. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. **Tropical Plant Pathology**, 39: 384-391.

CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JUNIOR, M.; SILVA, M. C. 2011. Controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, 36: 28-34.

DU, C.; LIN, J.; YANG, Y.; LIU, H.; LI, C.; ZHOU, Y.; LI, Y.; TANG, D.; ZHAO, X.; ZHU, Y.; LIU, X. 2014. Molecular cloning, characterization and function analysis of a GDH gene from *Sclerotinia sclerotiorum* in rice. **Molecular Biology Reports**, 41: 3683-3693.

FARR, D. F., ROSSMAN, A. Y. **Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA**. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>>. Acesso em 09 de Fev de 2015.

FERRAZ, L. C. L.; CAFÉ FILHO, A. C. 1998. Meios de cultura e fatores culturais para produção de escleródios e apotécios de *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, 23: 364-365.

- FERREIRA, D. F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, 35: 1039-1042.
- GARCIA, R. A.; JULIATTI, F. C.; CASSEMIRO, T. A. 2012. Produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em meio de cultura. **Bioscience Journal**, 28: 1-7.
- GERALDINE, A. M.; LOPES, F. A. C.; CARVALHO, D. D. C.; BARBOSA, E. T.; RODRIGUES, A. R.; BRANDÃO, R. S.; ULHOA, C. J.; LOBO JUNIOR, M. 2013. Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. **Biological Control**, 67: 308-316.
- GOMES, R. S. S. 2013. **Qualidade fisiológica de sementes de algodoeiro e comportamento *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, submetido a diferentes temperaturas.** Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia: UFPB, 45 p.
- GORGEN, C. A.; CIVARDI, E. A.; RAGAGNIN, V. A.; SILVEIRA NETO, A. N.; CARNEIRO, L. C.; LOBO JUNIOR, M. 2010. Redução do inóculo inicial de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja cultivada após uso do sistema Santa Fé. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 45: 1102-1108.
- JULIATTI, F. C.; CRATO, F. F.; JULIATTI, F. C.; COUTO, K. R.; JULIATTI, B. C. M. 2013. Escala diagramática para avaliação da severidade de mofo branco em soja. **Bioscience Journal**, 29: 676-680.
- NAPOLEÃO, R.; NASSER, L. C. B.; LOPES, C. A.; CAFÉ FILHO, A. C. 2006. Neon-S, a new medium for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on seeds. **Summa Phytopathologica**, 32: 180-182.
- PONMURUGAN, P; SARAVANAN, D.; RAMYA, M. 2010. Culture and Biochemical Analysis of a tea algal pathogen, *Cephaleuros parasiticus*. **Journal of Phycology**, 46: 1017-1023.
- SERRA, I. M. R. S & SILVA, G. S. 2005. Caracterização biológica e fisiológica de isolados de *Sclerotium rolfsii* obtidos de pimentão no estado do Maranhão. **Fitopatologia Brasileira**, 30: 61-66.
- SILVA, F. P. M.; GAVASSONI, W. L.; BACCHI, L. M. A.; GARCEZ, F. R. 2011. Germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes resíduos e extratos de plantas cultivadas. **Summa Phytopathologica**, 37: 131-136.
- TEIXEIRA, H.; ARIAS, S. M. S.; CHITARRA, L. G.; MACHADO, J. C. 2002. Eficiência comparativa de lâmpadas fluorescentes na detecção e quantificação de fungos em sementes. **Ciência e Agrotecnologia**. 26: 259-268.
- TERAMOTO, A.; PARISI, M. C. M.; CUNHA, M. G. 2013. Caracterização fisiológica de isolados de *Corynespora cassiicola*. **Tropical Plant Pathology**, 38: 313-322.
- VENTUROSO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; CONUS, L. A.; PONTIM, B. C. A. 2014. Relação de massa e localização do escleródio no solo com germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Summa Phytopathologica**, 40: 29-33.
- VRISMAN, C. M.; HULLER, G. C.; SARTORI, F. F.; HENNEBERG, L.; WUTZKI, C. R.; JULIATTI, F. C.; JACCOUD FILHO, D. S. 2014. Influência de herbicidas e fungicidas na germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Bioscience Journal**, 30: 477-483.