

INFLUÊNCIA DE MEIOS DE CULTURA, TEMPERATURA E pH NA  
PRODUÇÃO DE ESCLERÓDIOS DE *Sclerotinia minor* JAGGER

I.S. Melo<sup>1</sup>  
G.A. Conus<sup>2</sup>

INTRODUÇÃO

*Sclerotinia minor* infecta raízes de alface diretamente através de escleródios que germinam eruptivamente e um simples escleródio pode infectar e matar uma planta de alface (IMOLEHIM & GROHAN, 1982). Juntamente com *S. sclerotiorum* pode causar sérios danos a esta cultura em todo o mundo. *S. minor* é estritamente um fitopatógeno de solo e os escleródios constituem fontes efetivas de inóculo. Aproximadamente 90% do ciclo de vida de *Sclerotinia* spp. é gasto como escleródios (ADAMS & AYERS, 1982). Entre os fatores conhecidos que afetam a sobrevivência de escleródios no solo, as propriedades físicas do solo (ADAMS & TATE, 1975; IMOLEHIM *et alii*, 1980) e o micoparasitismo (ADAMS & AYERS, 1982) parecem exercer um importante papel. Para testes de inoculação, necessário se faz a obtenção de grande número de escleródios, viáveis, em meio de cultura. O presente trabalho, portanto, visou testar o efeito de diferentes meios de cultura, pHs e diferentes temperaturas na esporulação de um isolado patogênico de *S. minor*.

MATERIAL E MÉTODOS

**Isolado de *Sclerotinia minor*** - O fungo foi isolado de plantas de alface na região de Mogi das Cruzes, SP. Com uma agulha flambada retiraram-se escleródios da base de plantas infectadas, que foram desinfetadas com hipoclorito de sódio.

<sup>1</sup> CNPDA/EMBRAPA, Jaguariúna - SP.

<sup>2</sup> Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, Piracicaba.

clorito de sódio 2%, lavados com água destilada esterilizada e secos em papel filtro e incubados em meio de BDA a 26°C.

**Influência de Meios de Cultura na Produção de Escleródios de *S. minor*** - Foram testados 5 diferentes meios de cultura: V-8 (Suco V-8, 300 ml; CaCO<sub>3</sub>, 3g; Ágar, 15g; água, 1000 ml); Aveia-Ágar (farinha de aveia, 40g; Dextrose, 20g; Ágar, 15g; água, 1000 ml); BDA + NaCl (Batata, 200g; Dextrose, 20g; NaCl 1g; ágar, 15g; água, 1000 ml), de acordo com TUIITE (1969); Arroz-Ágar (farinha de arroz (mucilon), 15g; dextrose, 10g; ágar, 15g, água, 1000 ml) e Extrato de alface-ágar (folhas de alface, 300g; ágar, 15g; água, 1000 ml). As folhas de alface, colocadas por hora em 500 ml de H<sub>2</sub>O em vapor fluente, foram filtradas e 300 ml do extrato colocados no ágar - água esterilizado por 15 minutos a 120°C. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 4 repetições. Cada placa de Petri constituiu uma parcela. As culturas foram incubadas a 26°C, no escuro. As repicagens foram feitas para o centro das placas, utilizando-se discos de 5 mm de diâmetro de meio de cultura (BDA) contendo micélio e escleródios do patógeno. A avaliação foi feita dias após a repicagem pela contagem do número e peso de escleródios por placa.

**Influência da Temperatura na Esporulação de *S. minor*** - Cinco diferentes temperaturas (8°C, 13°C, 18°C, 23°C e 28°C) foram avaliadas no sentido de se saber a melhor faixa de temperatura para crescimento do patógeno, em meio de aveia-ágar. O delineamento experimental planejado foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições. Cada placa de Petri constituiu uma parcela. As diferentes temperaturas foram obtidas simultaneamente em incubadora com cinco compartimentos. A avaliação do crescimento micelial foi efetuada em intervalos de 24 horas a partir do 3º dia da inoculação, determinando-se o diâmetro das colônias com o auxílio de uma régua graduada, até que o crescimento do fungo atingisse o diâmetro da placa (9 cm).

**Influência de Diferentes pHs na Germinação de Escleródios de *S. minor*** - No sentido de se estabelecer a melhor faixa de pH para crescimento de *S. minor*, foram avaliados 6 faixas de pH em meio de ágar-água, a 26°C. Observou-se somente a germinação dos escleródios que foram colocados em número de 12 por placa. A germinação foi acompanhada sob microscópio estereoscópico.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Influência de Meios de Cultura na Produção de Escleródios de *S. minor*** - A análise de variância revelou um efeito altamente significativo para os meios de cultura, indicando o meio de aveia-ágar como superior aos demais meios (Quadro I), vindo em seguida BDA, Arroz, Suco V-8 e Alface-ágar. Observa-se que o meio de aveia-ágar produziu o dobro de escleródios quando comparado com BDA. O meio de alface-ágar, como substrato para o patógeno não favoreceu, sobremaneira, a esporulação. Muitos outros fitopatógenos têm melhor taxa de crescimento utilizando-se do próprio substrato da planta hospedeira.

Quadro I - Influência de meios de cultura na produção de escleródios de *S. minor*.

MEIOS DE CULTURA	REPETIÇÕES				MÉDIA <sup>1</sup>
	I	II	III	IV	
Aveia-ágar	1344	1824	1660	1640	1617 a
BDA+NaCl 0,1%	828	880	792	724	806 b
Arroz-ágar	350	455	420	391	404 c
Suco V-8	394	362	369	444	392 c
Alface-ágar	472	264	328	312	344 c

<sup>1</sup> Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1%.

**Influência de Meios de Cultura no Peso de Escleródios de *S. minor*** - Alguns fatores podem influenciar o tamanho dos escleródios de fungos formadores destas estruturas. Neste ensaio, observa-se que o meio de aveia-ágar, como no ensaio anterior, sobressaiu-se como aquele que produziu escleródios mais pesados. A avaliação constou da pesagem de 10 escleródios por placa. Os escleródios produzidos no meio de aveia-ágar (0,0387 g) foram bem maiores que os produzidos nos outros meios (Quadro II). O meio de aveia tem favorecido a esporulação de muitos outros fungos, como: *Colletotrichum graminicola* (MINUSSI, 1977); *Pyricularia oryzae* (NAMAY & YAMANAKA, 1983); *Humicola* sp. (RODRIGUES *et alii*). De acordo com NAMAI & YAMANAKA (1983), a prolamina presente na aveia é uma das substâncias responsáveis por este estímulo.

Quadro II - Influência de meios de cultura no peso de escleródios de *S. minor*. Dados em gramas.

MEIOS DE CULTURA	REPETIÇÕES <sup>1</sup>				MÉDIA <sup>2</sup>
	I	II	III	IV	
Aveia-ágar	0,0309	0,0458	0,0483	0,0298	0,0387 a
Arroz-ágar	0,0162	0,0257	0,0167	0,0248	0,0209 b
BDA+NaCl	0,0119	0,0123	0,0134	0,0137	0,0128 bc
Suco V-8	0,0124	0,0138	0,0109	0,0123	0,0124 bc
Alface-ágar	0,0048	0,0043	0,0052	0,0035	0,0045 c

<sup>1</sup> Peso de 10 escleródios por placa.

<sup>2</sup> Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1%.

Os menores escleródios, e conseqüentemente os mais leves, foram produzidos nos meios de alface-ágar, suco V-8 e BDA. O volume dos esporos de *Botrytis cinerea* e *Monilinia fruticola* foi aumentado quando estes patógenos se desenvolveram em meio definido contendo altas concen-

trações de glucose, (PHILLIPS *et alii*, 1987 e 1988). Este efeito tem importância na agressividade dos patógenos à roseira e pessegueiro, respectivamente. No presente trabalho, não foi testado o feito do inóculo, produzido nos diferentes meios, na severidade da doença em plantas de alface.

**Influência da Temperatura no Crescimento Micelial de *S. minor*** - Os resultados (Quadro 3) mostram que já nos 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> dias se observa o crescimento em todas as temperaturas, exceto em 8°C; sendo 23°C a melhor com 45,26% e 82,11%, respectivamente. Esta progressão continuou nos 5<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> dias, quando o fungo atingiu todo o diâmetro da placa de Petri. As temperaturas mais baixas, de 8 e 13°C, jamais favoreceram o crescimento do fungo. Sabe-se que *S. minor* é favorecido por temperaturas amenas. Na região de Mogi das Cruzes, onde o fungo foi isolado, prevalecem temperaturas de 20 a 28°C, ideais para o desenvolvimento da cultura da alface, pois temperaturas mais altas afetam o crescimento vegetativo da planta, favorecem a emissão do pendão floral e descaracterizam, portanto, o produto comercial. Pelo exposto pode-se considerar as temperaturas entre 18 e 23°C como as ideais para crescimento *in vitro* de *S. minor*.

Quadro III - Porcentagem do crescimento micelial de *S. minor* em diferentes temperaturas.

TEMPERATURAS (°C)	3 <sup>o</sup> DIA <sup>1</sup>	4 <sup>o</sup> DIA	5 <sup>o</sup> DIA	6 <sup>o</sup> DIA
08	00,00	00,00	15,79	24,53
13	13,68	33,68	55,79	87,37
18	26,32	61,05	95,79	100,00
23	45,26	82,11	100,00	100,00
28	32,63	46,32	70,63	87,00

<sup>1</sup> Médias de 4 repetições.

À temperatura de 23°C houve produção homogênea de escleródios em toda placa no 5º dia de crescimento, sendo estes escleródios de tamanho menor do que aqueles produzidos à 28°C. Nas temperaturas de 8°C e 13°C, o crescimento micelial foi bastante lento, não havendo formação de escleródios, somente formação cotonosa de micélio.

**Influência do pH na Germinação de Escleródios de *S. minor*** - Pelos resultados obtidos (Quadro IV), observa-se que somente o pH 9,0 reduziu em 50% a germinação dos escleródios *in vitro*. Os pHs mais ácidos favoreceram completamente a germinação dos mesmos. Este fato tem importância fundamental no controle da doença, pois a cultura da alface no Estado de São Paulo é estabelecida em solos turfosos, com pH alcalino. No entanto, fortes infestações do patógeno têm ocorrido, causando sérios problemas à cultura. Pelos resultados aqui obtidos, percebe-se que 85,42% dos escleródios germinaram no pH 8,0 e 93,74% no pH 7,0. Em geral, a germinação não foi seriamente afetada com os pHs de 4,0 a 8,0. Necessário se faz, portanto, testar mais isolados deste patógeno, provenientes de regiões distintas e de outros hospedeiros, a fim de se estabelecer com segurança a melhor faixa de pH para crescimento *in vitro*.

Quadro IV - Influência do pH na germinação de escleródios de *S. minor*. Porcentagem de germinação de escleródios em ágar-água.

pH	REPETIÇÕES <sup>1</sup>				MÉDIA <sup>2</sup>
	I	II	III	IV	
4,0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00 a
5,0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00 a
6,0	100,00	100,00	91,66	91,60	95,83 a
7,0	100,00	91,66	91,66	91,60	93,74 a
8,0	100,00	75,00	66,66	100,00	85,42 a
9,0	66,66	58,33	25,00	50,00	50,00 b

<sup>1</sup> Cada parcela constou de 12 escleródios/placa.

<sup>2</sup> Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

## RESUMO

Estudou-se a influência de diferentes meios de cultura, temperaturas e níveis de pH sobre o crescimento micelial e a produção de escleródios do fungo *Sclerotinia minor*, agente causal da podridão em alface. O efeito do pH foi avaliado quanto a germinação dos escleródios em meio de cultura. Os resultados mostraram que houve diferenças com relação aos meios de cultura utilizados, tanto na produção de escleródios quanto no peso dos mesmos, destacando-se o meio de aveia-água como aquele que estimulou o crescimento de *S. minor*. A faixa de temperatura entre 18 e 23°C foi a que melhor favoreceu o crescimento micelial do patógeno. Não houve diferença sensível na germinação dos escleródios nos diferentes pHs, exceto o pH 9,0, que reduziu a germinação em 50%.

## SUMMARY

INFLUENCE OF DIFFERENT CULTURE MEDIA, TEMPERATURE AND pH ON THE SCLEROTIUM PRODUCTION OF *Sclerotinia minor* JAGGER

The effect of different culture media, temperatures and pH on the mycelial growth and sclerotium production of a *S. minor* isolate was studied *in vitro*. The results obtained showed that there were significant differences in relation to the media used for sclerotium production and size. In general, the oat-agar medium showed highest growth rate. The temperatures for highest mycelial growth occurred between 18 and 28°C, whereas all the pHs tested, except pH 9,0, increased the sclerotial germination.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, P.B. & C.J. TATE, 1975. Factors affecting lettuce drop caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis. Rep.*, 59: 140-143.
- ADAMS, P.B. & W.A. AYERS, 1982. Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, 69: 896-899.
- IMOLEHIM, E.D.; R.G. GROGAN & J.M. DUNIWAY, 1980. Effect of temperature and moisture on growth, sclerotial production, germination and infection by *Sclerotinia minor*. *Phytopathology*, 70: 1153-1157.
- IMOLEHIM, E.D. & R.G. GROGAN, 1982. Factors affecting survival of sclerotia, and effects of inoculum density, relative position and distance of sclerotia from the host on infection of lettuce by *Sclerotinia minor*. *Phytopathology*, 70: 1162-1167.
- MINUSSI, E., 1977. Taxonomia e esporulação de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. (sensu ARX, 1957) e patogenicidade em sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Tese de Doutorado - ESALQ/USP.

- NAMAI, T. & S. YAMANAKA, 1983. A component contained in oat meal that favours the sporulation of rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, 49: 274-276.
- PHILLIPS, D.J.; D.A. MARGOSAN, & B.E. MACKEY, 1987. Size, nuclear number, and aggressiveness of *Botrytis cinerea* spores produced on media of varied glucose concentrations. **Phytopathology**, 77: 1606-1608.
- PHILLIPS, D.J.; D.A. MARGOSAN, & B.E. MACKEY, 1988. Volume, nuclear number, and aggressiveness of conidia of *Monilinia fruticula* produced on media of varied glucose concentrations at 15 and 25°C. **Phytopathology**, 79: 401-403.
- RODRIGUES, E.C.; A.A. PIZZIRANI-KLEINER; Y. TANAKA & J.A. JORGE. Cytogenetic and Biochemical Aspects of the cellulolytic fungus *Humicola* sp. **Mycological Research** (no prelo).