



METODOLOGIAS DE INOCULAÇÃO DE FUNGOS CAUSADORES DA PODRIDÃO RADICULAR DA MANDIOCA

Camila Santiago Hohenfeld⁽¹⁾, Daniela de Souza Nascimento⁽²⁾, Marcondes Araújo da Silva⁽³⁾, Eder Jorge de Oliveira⁽⁴⁾ e Saulo Alves Santos de Oliveira⁽⁴⁾

¹Estudante de Pós-graduação em Recursos Genéticos da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Rua Rui Barbosa, 710, Centro, Cruz das Almas-BA, 44380-000, E-mail: chohenfeld@gmail.com; ²Estudante de Licenciatura em Biologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Rua Rui Barbosa, 710, Centro, Cruz das Almas-BA, 44380-000, danysouza@hotmail.com; ³Bolsista de Pós-Doutorado da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Rua Embrapa, s/n, Chapadinha, CEP 44380-000, Cruz das Almas-BA, marcondesagronomo@gmail.com; ⁴ Pesquisador, Doutor da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Rua Embrapa, s/n, Chapadinha, CEP 44380-000, Cruz das Almas-BA, E-mail: eder.oliveira@embrapa.br, saulo.oliveira@embrapa.br

Temática: Fitopatologia

Resumo

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma espécie que possui destacada importância econômica e social na África, Ásia e América Latina. Contudo, várias doenças podem afetar sua produtividade, dentre elas a podridão radicular, causada por um complexo de patógenos, destacando-se os fungos *Phytophthora* spp., *Botryosphaeria* spp. e *Fusarium* spp. As perdas podem chegar a 100%, dependendo da intensidade da infestação. Atualmente, a abordagem mais econômica e confiável para controlar a podridão radicular da mandioca é o plantio de variedades resistentes. Assim, objetivo foi estabelecer um método de inoculação de fungos para seleção precoce de genótipos de mandioca resistentes à podridão radicular. Foram testadas quatro metodologias distintas: Infestação do Solo, Imersão de Manivas, Imersão das raízes e Ferimento na haste. Os parâmetros avaliados foram peso de parte aérea, peso de raiz, volume de raiz e colonização da maniva. O método que se mostrou mais eficiente foi infestação do solo e imersão de manivas em suspensão de esporos.

Palavras Chave: doenças radiculares, *Manihot esculenta* Crantz, melhoramento de plantas.

Introdução

Dentre as doenças que podem afetar a produtividade da mandioca, a podridão radicular, causada por um complexo de patógenos, classificados em podridão mole (*Phytophthora* spp.), podridão seca (*Fusarium* spp.) e podridão negra (família Botryosphaeraeae), vem se tornando uma doença de alto impacto econômico e social nos principais países produtores, além da queda na produção, inutiliza as áreas para plantio ao longo dos ciclos da cultura (Notaro, 2012).

O uso de variedades resistentes tem sido apontada como uma estratégia de controle em diversas regiões produtoras, porém um dos grandes desafios da identificação de fontes de resistência no germoplasma de mandioca é a falta de metodologias adequadas para seleção de fontes de resistência por meio de inoculações artificiais, de modo a refletir o verdadeiro comportamento dos genótipos em condições de campo. O método de raiz destacada foi utilizado por Oliveira et al., (2013) para a seleção de variedades resistentes, porém além do ciclo de 12 meses da cultura pra obtenção das raízes, é possível que exista mecanismos de resistência em outros tecidos da planta. Assim, este trabalho tem como objetivo adaptar e validar metodologias de inoculação em diferentes tecidos para seleção precoce de genótipos de mandioca resistentes à podridão radicular.

Material e Métodos

Foi utilizado um mix de diferentes espécies de patógenos causadores de podridão seca (*Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*) e podridão negra (*Neoscytalidium dimidiatum* e *Lasiodyplodia theobromae*), incubados em meio batata dextrose ágar (BDA) e de podridão mole (*Phytophthora drechsleri* e *Phytophthora melonis*) incubados em meio cenoura ágar



(CA) por sete dias em BOD na temperatura de 25 °C, todos foram adquiridos na micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Foram avaliados quatro métodos de inoculação, conduzidos durante o período de junho a dezembro de 2014 em telado com irrigação diária:

a) Método de infestação do solo

- Tratamento 1 - Solo não infestado x Maniva sadia (controle)
- Tratamento 2 - Solo infestado por patógenos de podridão seca x Maniva sadia
- Tratamento 3 - Solo infestado por patógenos de podridão mole x Maniva sadia
- Tratamento 4 - Solo infestado por patógenos de podridão negra x Maniva sadia

A infestação do solo foi feita pela mistura de areia e fubá (proporção 3:1) infestada com inóculo de cada patógeno. Manivas de 10 cm das variedades Olho Junto e Fécula Branca foram plantadas em sacos plásticos de 3kg, contendo o solo infestado. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 2 (variedades) x 7 (tratamentos) x 3 repetições (6 plantas cada).

b) Método de imersão de manivas:

- Tratamento 1 - Solo não infestado x Maniva sadia (controle)
- Tratamento 2 - Solo não infestado x Maniva infestada por patógenos de podridão seca
- Tratamento 3 - Solo não infestado x Maniva infestada por patógenos de podridão mole
- Tratamento 4 - Solo não infestado x Maniva infestada por patógenos de podridão negra

Para a imersão de raízes, manivas de 10 cm das variedades Olho Junto e Fécula Branca foram imersas por 1 hora em suspensão de esporos (1×10^5 conídios/mL) de cada patógeno e posteriormente plantadas em sacos plásticos de 3kg contendo solo esterilizado. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 2 (variedades) x 7 (tratamentos) x 3 repetições (6 plantas cada).

c) Método de imersão das raízes:

As manivas das variedades BRS Kiriris, Fécula Branca, Cascuda, BRS Formosa e Olho Junto foram germinadas em leito de areia por 15 dias. As raízes foram imersas em suspensão de esporos (1×10^5 conídios/mL) de cada patógeno por 1 hora e depois plantadas em sacos plásticos de 3 kg contendo solo esterilizado. O tratamento controle foi representado por plantas com seus sistemas radiculares mergulhados apenas em água esterilizada. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 variedades x 2 Tratamentos x 4 repetições (6 plantas cada) x 3 (patógenos).

d) Método de ferimento na haste:

Foram utilizadas hastes de 12 cm das variedades BRS Kiriris, Olho Junto, Fécula Branca, Cascuda e BRS Formosa, desinfestadas com hipoclorito 1%. O ferimento foi realizado com o auxílio de um perfurador entre as duas primeiras gemas da maniva e posteriormente depositado um disco com estruturas fúngicas de 0,8 cm de diâmetro de cada patógeno, os discos foram cobertos com algodão úmido e envolvidos com fita rolo de filme PVC, para evitar contaminação externa. Para a testemunha foram depositados discos do meio ágar-água. As hastes foram plantadas em sacos de 3kg contendo solo esterilizado. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 variedades x 2 Tratamentos x 4 repetições (6 plantas cada) x 3 (patógenos).

Dois meses após a inoculação, de todas metodologias, foram avaliadas o Peso de Parte Aérea, Peso de Raiz, Volume de Raiz e o Índice de Doença (ω) (CZERMAINSK, 1999), que foi calculado por meio de uma escala de notas da colonização da maniva, em que 0 = não colonizado; 1 = colonização $< 1/3$; 2 = colonização $\geq 1/3$ e $< 2/3$ e 3 = colonização $\geq 2/3$. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e as médias agrupadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade, ambas conduzidas por meio do software estatístico R.

Resultados e Discussão

É importante que se tenha um método alternativo e que tão eficiente como o de raiz destacada (Oliveira et al.,2013) para inoculação de patógenos causadores de podridão



radicular da mandioca. Dentre as quatro metodologias testadas, o método de imersão das raízes e de ferimento na haste não apresentou sintomas típicos de podridão radicular durante o período de avaliação de dois meses, diferindo de trabalhos de inoculação com outras espécies de *Fusarium*, que fizeram uso da imersão de raízes (Cavalcanti et al., 2002). Contudo, não se sabe se a avaliação por um período maior de tempo permitiria a expressão dos sintomas. Independente disso, o longo período para manifestação dos sintomas da doença reduz a eficácia do método nos quesitos de praticidade e rapidez na seleção do germoplasma em busca de fontes de resistência (Silva et al., 2011).

Na metodologia por infestação de solo e imersão de manivas, exceto o controle, todos os tratamentos testados, independente da espécie fúngica inoculada, proporcionaram sintomas característicos da doença, como murcha e amarelecimento das folhas, em um período de 45 dias após a inoculação, culminando com a morte da planta aos 60 dias após a inoculação. Dentre os sete tratamentos avaliados, o controle apresentou valores superiores do peso de parte aérea, peso de raiz, volume de raiz e um menor valor quanto ao índice de doença, diferindo-se estatisticamente dos demais tratamentos para todas as variáveis analisadas. As plantas não inoculadas mantiveram-se sadias durante todo o período de avaliação.

Os tratamentos infestação do solo por patógenos de podridão seca e por patógenos de podridão negra, possibilitaram uma redução de mais de 80% da parte aérea das plantas (Figura 1A), seguidos do tratamento infestação do solo por podridão mole que resultou em uma redução de 60% na parte aérea das plantas em relação ao controle. Para as variáveis peso de raiz e volume de raiz, os tratamentos apresentaram o mesmo comportamento, onde podridão seca e podridão negra, diferiram estatisticamente da podridão mole, apresentando um peso de raiz $\leq 0,50$ g e um volume $\leq 0,64$ cm³ (Figura 1 B-C). Quanto a colonização da maniva, mensurado pelo índice de doença (ω), a infestação do solo por patógenos de podridão mole diferiu estatisticamente dos demais, apresentando total colonização das manivas. Os outros dois tratamentos apresentaram uma menor, porém significativa, colonização da haste (Figura 1D).

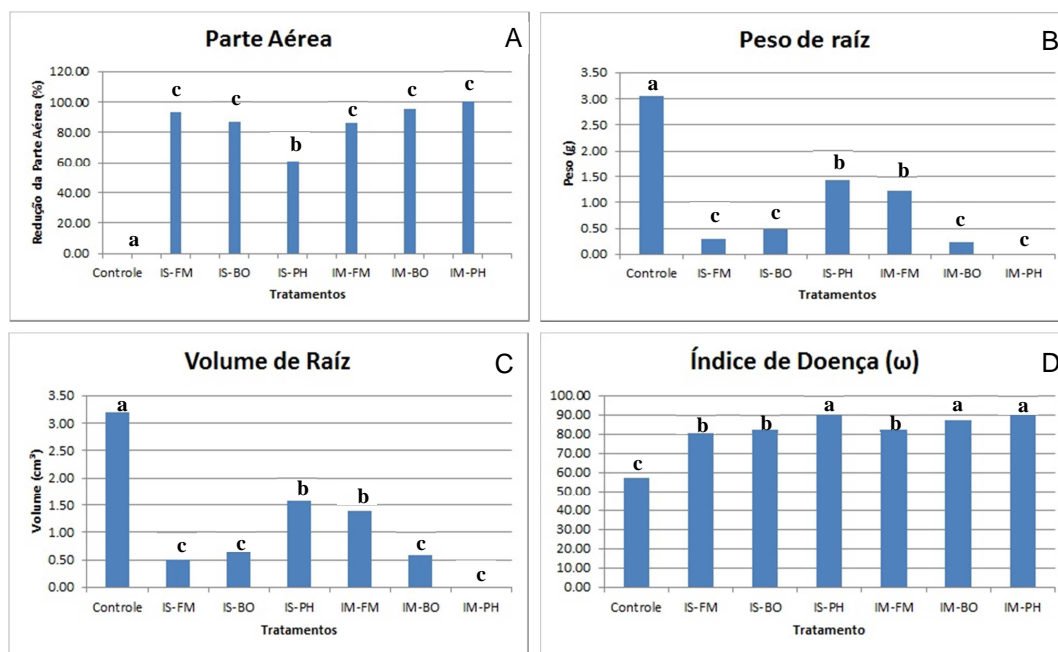


Figura 1. Comparações das médias agrupadas pelo teste Scott-Knott a 5% entre os tratamentos: Solo infestado por Podridão Seca (IS-FM); Solo infestado por Podridão Mole (IS-PH); Solo infestado por Podridão Negra (IS-BO); maniva infestada por Podridão Seca (IM-FM); maniva infestada por Podridão Mole (IM-PH); maniva infestada por Podridão Negra (IM-BO) e maniva sadia (controle) avaliados quanto as variáveis Peso de Parte Aérea (A), Peso de Raiz (B), Volume de Raiz (C) e Índice de Doença (ω) (D).



O método de imersão de manivas, proporcionou para as três doenças, uma redução de mais de 80% na parte aérea em relação ao controle, não diferindo estatisticamente entre si. Em relação às variáveis peso de raiz e volume de raiz, a imersão por patógenos de podridão negra e podridão mole apresentaram um peso de raiz $\leq 0,23(g)$ e um volume $\leq 0,58 \text{ cm}^3$, diferindo estatisticamente da podridão seca que apresentou peso de raiz de 1,22 g e um volume de 1,38 cm^3 . Para o índice de doença (ω), a imersão por patógenos de podridão mole e podridão negra apresentaram uma colonização quase que total da maniva e diferiram estatisticamente do grupo de isolados da podridão seca, que apresentou uma menor, porém significativa colonização da maniva, em relação ao controle. A eficiência dessa metodologia para a avaliação da podridão mole pode ser atribuído ao fato de que oomicetos quando colocados em água, formam uma grande quantidade de zoosporângios e oósporos (Figueredo e Albuquerque, 1970).

Conclusão

- 1) Como metodologia artificial de inoculação, a infestação do solo foi mais eficiente para a avaliação do grupo de patógenos da podridão seca. Para a podridão negra, não houve diferença entre os dois métodos testados. Por outro lado, a imersão de manivas foi mais eficiente para a avaliação da podridão mole.
- 2) O mais adequado seria utilizar a combinação de metodologias (imersão de maniva e solo infestado) para um *screening* do germoplasma para identificação precocemente de fontes de resistência às três doenças.

Agradecimentos

Agradecimento à CAPES, Fapesb e CNPq pela concessão à bolsa e auxílio financeiro para a pesquisa.

Bibliografia

CAVALCANTI, L.S.; COÊLHO, R.S.B.; PEREZ, J.O. Utilização de dois métodos de inoculação na avaliação da resistência de cultivares e linhagens de feijoeiro a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, p.1-5, 2002.

CZERMAINSKY, A.B.C. Generalização de um índice de intensidade de infecção em experimentos de avaliação de doenças em plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 1545-1555, 1999.

FIGUEREDO, M.M; ALBUQUERQUE, F.C. Podridão Mole das raízes de mandioca (*Manihot esculenta*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.5, p.389-393, 1970.

NOTARO, K.A. Prospecção de fitopatógenos e caracterização de solos arenosos envolvidos na supressividade ou conducividade da podridão radicular da mandioca causada por *Scytalidium lignicola*. Garanhuns: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2012. 104 p. Dissertação Mestrado.

SILVA, A.S. Seleção de metodologias para inoculação da fusariose do maracujazeiro causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *Passiflorae* [recurso eletrônico] / Aline dos Santos Silva... [et al.]. - Dados eletrônicos. - Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Mandioca e Fruticultura, ISSN 1809-5003; 20 p.).

OLIVEIRA, S.A.S.; HOHENFELD, C.S.; SANTOS, V.S.; HADDAD, F.; OLIVEIRA, E.J. Resistance to *Fusarium* dry root rot disease in cassava accessions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, p.1414-1417, 2013.