

17. LENNÉ, J.M., BURDON, J.J. Preliminary study of virulence and isozymic variation in natural populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes guianensis*. **Phytopathology**, St. Paul, v.80, p. 728-731, 1990.
18. MICALES, J.A., ALFENAS, A.C., BONDE, M.R. Isoenzimas na taxonomia e genética de fungos p.477-511. In: ALFENAS, A.C. (Ed.) **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins, fundamentos e aplicações**. Viçosa: Editora UFV, 1998. 574p.
19. PINTO, C.M.F., PAULA JR, T.J., ZAMBOLIM, L. Doenças causadas por fungos em cebola. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.17, p.28-45, 1995.
20. REGO, A.M., MAFFIA, L.A., ALFENAS, A.C. Virulência e análise de isoenzimas de *Colletotrichum orbiculare*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, p.552-559, 1994.
21. RIDGWAY, G.J., SHELBURNE, S.W., LEWIS, R.D. Polymorphisms in the esterases of Atlantic herring. **Transactions of the American Fisheries Society**, Bethesda, v.99, p.147-151, 1970.
22. SELANDER, R.K., YANG, S.Y. Protein polymorphism and genetic heterozygosity in a wild population of the house mouse (*Mus musculus*). **Genetics**, Austin, v.63, p.653-667, 1969.
23. SILICIANO, M.J., SHAW, C.R. Separation and visualization of enzymes on gels. In: SMITH, I. (Ed.) **Chromatographic and Electrophoretic Technique**. William Heinemann Medical Books, v.2, p.185-209, 1976.
24. SOLTIS, D.E., HAUTLER, C.H., DARROW, D.C., GASTONY, G.J. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. **American Fern Journal**, v.73, p.9-27, 1983.
25. TROUT, C.L., TEBEEST, D.O. Analysis of *Colletotrichum* species using RFLPS. **Phytopathology**, St. Paul, v.82, p.1086, 1992. (Abst.).
26. VERAS, S.M., GASPAROTTO, L., MENEZES, M. Avaliação isoenzimática de *Colletotrichum guaraniicola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22 (suplemento), p.323, 1997 (abstract).

Influência do método de inoculação e da quantidade de inóculo de *Sclerotium rolfsii* na severidade de podridão do colo do feijoeiro

Keith C. Chaves¹, Jefferson L. da S. Costa²

¹Universidade Católica de Goiás, C.P. 86, CEP 74.605-010, Goiânia, GO, Bolsista da Embrapa.

²Embrapa Arroz e Feijão, C.P. 179, Santo Antônio de Goiás, GO, Bolsista do CNPq.

Aceito para publicação em: 05/07/99.

RESUMO

Chaves, K.C., Costa, J.L. da S. Influência do método de inoculação e da quantidade de inóculo de *Sclerotium rolfsii* na severidade de podridão do colo do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 25, p. 298-302, 1999.

A podridão do colo do feijoeiro comum, causada por *Sclerotium rolfsii* Sacc., é uma doença de difícil controle. O objetivo deste trabalho foi determinar a quantidade de inóculo no solo necessária para ocorrência da doença tendo em vista sua utilização na avaliação do germoplasma. Para determinação da quantidade ideal de inóculo e método de inoculação, foram conduzidos três ensaios em solo conducente e supressivo e repetidos duas vezes. No primeiro ensaio foi utilizado farelo de grãos de sorgo colonizados com micélio do patógeno, o qual foi adicionado ao solo, nas doses de 0, 1, 2, 4 e 8 gramas/kg de solo. Para o segundo e terceiro

ensaios utilizou-se como inóculo escleródios do patógeno desenvolvidos em hastes de feijoeiro nas doses de 0, 1, 2, 4, 8 e 16 unidades, adicionados diretamente na cova e 0,00; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 e 1,00 gramas dessa mesma estrutura por quilo de solo, respectivamente. O melhor método para infestação do solo e quantidade de inóculo, consistiram da adição de quatro gramas de sorgo colonizado/kg de solo, provavelmente pelo fato do inóculo entrar em contato com as sementes durante o processo de germinação. Em 25 genótipos avaliados foram observadas variações na severidade da doença.

Palavras-chave adicionais: *Phaseolus vulgaris*, epidemiologia.

Chaves, K.C., Costa, J.L. da S. Influence of the inoculation method and of the inoculum density of *Sclerotium rolfsii* in the severity of dry bean stem rot. *Summa Phytopathologica*, v. 25, p. 298-302, 1999.

Dry bean stem rot caused by Sclerotium rolfsii Sacc is a disease hard to control. The objective of this study was to determine the minimum soil inoculum density necessary for the occurrence of the disease and to use it in the evaluation of bean germplasm. To determine the ideal soil inoculum density, three experiments were conducted in conducive and suppressive soils. In the first experiment, pathogen mycelia were produced in ground sorghum grains and added to the soil, at the rates of 0, 1, 2, 4 and 8 grams of colonized sorghum per kg of soil. In the second and third tests, pathogen esclerotia were used as inoculum in the following rates:

0, 1, 2, 4, 8 and 16 sclerotia placed directly in the pit and 0.00, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50 and 1.00 gram of sclerotia incorporated per kg of soil. Each assay was repeated twice. It was determined that the best method for soil infestation and the ideal soil inoculum density consisted of the addition of four grams of colonized sorghum per kg of soil, since the inoculum gets in contact with the seed during the germination process. By using this method 25 genotypes of dry beans were tested in greenhouse and presented high disease severity variation.

Additional keywords: Phaseolus vulgaris, epidemiology.

Sclerotium rolfsii Sacc. é fungo causador de danos à cultura do feijoeiro. A podridão do colo é letal para a planta infectada, independente de seu estado fenológico e, em consequência, ocorrem perdas da produção pela redução do estande, durante todo o ciclo da cultura (3).

O *S. rolfsii* é fungo polífago e se desenvolve em diferentes tipos de solos e variações de pH (6). O pH ótimo para a maioria das espécies de *Sclerotium rolfsii* está ao redor de 5,6 (9). O controle eficiente é dificultado, devido ao elevado número de hospedeiros, capacidade de competição saprofítica e número de escleródios produzidos e acumulados no solo em cada ciclo das culturas.

A incidência da podridão do colo aumenta após períodos com variação na temperatura e umidade, provavelmente pelo efeito direto sobre a germinação dos escleródios (12) e indireto pelo estresse causado ao hospedeiro (3). No solo, quanto maior a profundidade maior é a umidade e menor a aeração (11). FLADOS (5) observou que com aumento da umidade, o crescimento do fungo no solo era reduzido pelo decréscimo nos níveis de O₂, o qual favorece os organismos antagonísticos, inibidores do crescimento do patógeno. A influência da oxigenação e umidade sobre *S. rolfsii* foi avaliada *in vitro* por PÉREZ SENDÍN & GONZÁLEZ BARRIOS (10), os quais observaram que, com diminuição da aeração e aumento da umidade, ocorria diminuição significativa no crescimento micelial e formação de escleródios.

Os escleródios têm papel predominante na epidemiologia da doença. Elevada densidade populacional dessas estruturas no campo pode estar relacionada com o tipo de preparo do solo para a semeadura nos últimos anos e, também com o fato de não terem sido cultivadas espécies com resistência a este fungo (11). Solos não-cultivados apresentam número reduzido de escleródios, devido ao fato de não terem sido trabalhados, razão pela qual a aeração do solo é menor, e de apresentarem baixa frequência de hospedeiros suscetíveis. Em campos cultivados com feijoeiro e com rotações com espécies suscetíveis ao fungo, o número de escleródios pode aumentar anualmente devido a manipulação de instrumentos ou ferramentas de cultivo (8) favorecedores da aeração do solo mesmo nas maiores profundidades. Em experimentos realizados em condições controladas, foi observado que escleródios localizados na superfície do solo apresentavam sobrevivência superior quando comparados com as profundidades de 5-6 cm (2).

Dentre as medidas de controle, que tem sido recomendadas, inclui-se o tratamento químico das sementes e solo, calagem, aplicação de resíduos orgânicos com elevada relação C/N, como palha de milho e aveia e, aração profunda, uma vez que os escleródios são sensíveis a elevadas tensões de CO₂ (1, 13). Apesar dos relatos de HERNANDEZ-GUTIERREZ & GARCIA (7), quanto a resistência do feijoeiro a *Sclerotium rolfsii*, até o presente, não foram ainda identificadas cultivares de feijoeiro com resistência ao patógeno, apesar de ser esta uma das medidas de controle mais desejáveis pelo baixo custo e preservação do ambiente.

O objetivo do presente estudo foi determinar a quantidade de inóculo no solo para causar a podridão de colo em feijoeiro em dois tipos de solos, empregando-se micélio e escleródios como fontes de inóculo, tendo em vista fornecer subsídios aos programas de melhoramento de feijoeiro buscando fontes com resistência a esse patógeno.

MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram realizados em condições de laboratório, sala climatizada e casa de vegetação da Embrapa Arroz e Feijão, localizada no município de Santo Antônio de Goiás, GO. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com cinco repetições. Todos os ensaios foram repetidos duas vezes. Os dados obtidos foram submetidos a análise conjunta de variância e as médias comparadas através do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Determinação da quantidade de inóculo no solo. Para esse estudo utilizou-se um solo cultivado e um solo não cultivado. Os solos são classificados como latossolo vermelho escuro e foram coletados até 30 cm de profundidade. O solo cultivado possuía alta condutância, comprovada em ensaios preliminares pelo favorecimento da ocorrência da doença pelo patógeno. O solo não cultivado possuía características de supressivo, pois a ocorrência de doenças era menos evidente. Para o primeiro ensaio, como substrato para a fonte de inóculo, foi utilizado sorgo granífero colonizado com *S. rolfsii*. Para a inoculação do substrato de multiplicação, o inóculo foi micélio do fungo desenvolvido durante sete dias em meio BDA (Batata-dextrose-ágar) disposto em bandejas de alumínio (20 x 15) utilizado para infestar 300 gramas

de sorgo com 60% de umidade. Após inoculados os grãos de sorgo foram incubados, em condições de laboratório ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), por dez dias. Após, o sorgo colonizado foi desagregado manualmente, distribuído em bandejas e seco ao ar por quatro dias. Após a secagem foi triturado em liquidificador e peneirado em peneira (30 mesh), para uniformização do tamanho das partículas. No primeiro ensaio, foram empregadas as densidades de inóculo: 0, 1, 2, 4 e 8 gramas de substrato colonizado por kg de solo. Após infestado, o solo foi distribuído em copos de polietileno descartáveis, com orifícios na base, com capacidade para 300 gramas, os quais foram transferidos para casa de vegetação.

No segundo e terceiro ensaio, foram utilizados escleródios multiplicados em hastes de feijão da cultivar Rosinha. Para tanto, cinco discos de ágar com 5 mm de diâmetro, contendo estruturas do fungo com sete dias de idade, foram transferidos para Erlenmeyers com capacidade de 250 ml, contendo 60 segmentos de 20 cm de hastes frescas de feijão esterilizados. Após incubação durante 15 dias, os escleródios foram coletados em uma peneira e postos para secar ao ar. Para determinar a viabilidade dos escleródios, amostras destes foram esterilizadas em etanol 50% e hipoclorito de sódio a 1% por um minuto, sendo em seguida lavadas em água estéril. Após desinfestação, 50 escleródios foram transferidos individualmente para cada placa de Petri contendo o meio BDA, incubados durante cinco dias e avaliados visualmente através da observação do crescimento micelial. A constatação foi de que 100% dos escleródios estavam viáveis.

Os ensaios utilizando escleródios foram instalados em vasos de alumínio com capacidade para 1 kg, contendo os dois tipos de solos, conducente e supressivo. Os escleródios foram incorporados ao solo de duas formas: a) diretamente na cova de plantio em números de 0, 1, 2, 4, 8, e 16 escleródios e b) adicionando 0; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 e 1,00 grama de escleródios por kg de solo, de forma homogeneizada. Em cada vaso inoculado ou não, foram semeadas cinco sementes de feijão da cultivar Rosinha. Os vasos foram mantidos em condições de casa de vegetação.

Os parâmetros avaliados consistiram de determinação do estande, peso da matéria seca, severidade de doença e atividade microbiológica total do solo.

A avaliação do estande foi efetuada através da contagem do número de plantas emergidas em cada vaso, aos 21 dias após a semeadura.

Para avaliação do peso de matéria seca das plântulas germinadas, estas foram retiradas do solo, lavadas e transferidas para estufa de secagem a 70°C por 24 horas para posterior pesagem e o peso da matéria seca expresso em gramas por parcela experimental.

A severidade da doença foi avaliada, aos 21 dias da semeadura, utilizando-se a escala de notas de 1 a 9 descrita por SCHOONHOVEN & PASTOR-CORRALES (14), sendo 1=nenhum sintoma e 9=planta morta. Também a atividade microbiológica do solo foi determinada através do método da dehidrogenase de fluoresceína diacetato, adaptado por COSTA (4) e encontra-se expressa em mg de fluoresceína diacetato hidrolisada/min/g de solo.

Avaliação da reação de cultivares comerciais de feijoeiro à podridão do colo. Foram realizados ensaios em vasos em casa de vegetação, em solo cultivado, infestado com 4 gramas de farelo de grãos de sorgo colonizado para cada kg de solo. Para cada cultivar das 25 descritas no Quadro 2, foram utilizados cinco vasos

com 1 kg de solo. Em cada vaso foram semeadas cinco sementes de cada cultivar, totalizando 25 plantas/tratamento. As cultivares foram avaliadas aos 21 dias da semeadura e a caracterização foi realizada utilizando os parâmetros descritos anteriormente, associando-se à velocidade do aparecimento de sintomas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação da quantidade de inóculo no solo. Os dados obtidos no ensaio com utilização de micélio veiculado em sorgo indicam que a severidade de doença nos solos conducentes apresenta uma tendência linear de crescimento, à medida que se aumenta a densidade de inóculo (Figura 1). Para o solo supressivo não se observou essa mesma situação e o aumento significativo da severidade de doença foi encontrado na concentração de oito gramas de inóculo/kg de solo. O efeito competitivo dos organismos antagonistas deste solo pode ser o provável responsável por este efeito tamponante, o que pode ser constatado pelos valores médios de severidade de 7,2 no solo conducente contra o valor médio de 5,3 no solo supressivo (Quadro 1). O aumento da densidade de inóculo reduziu a população de plantas. No solo supressivo, a população de plantas foi reduzida apenas na dose de inóculo de oito gramas de inóculo por kg de solo (Figura 2). A atividade microbiológica do solo e o peso da matéria seca não foram alterados em função dos tratamentos empregados (Figura 1). A quantidade de inóculo capaz de causar a doença, numa situação ideal para diferenciar genótipos, foi de 4 gramas de inóculo por kg de solo.

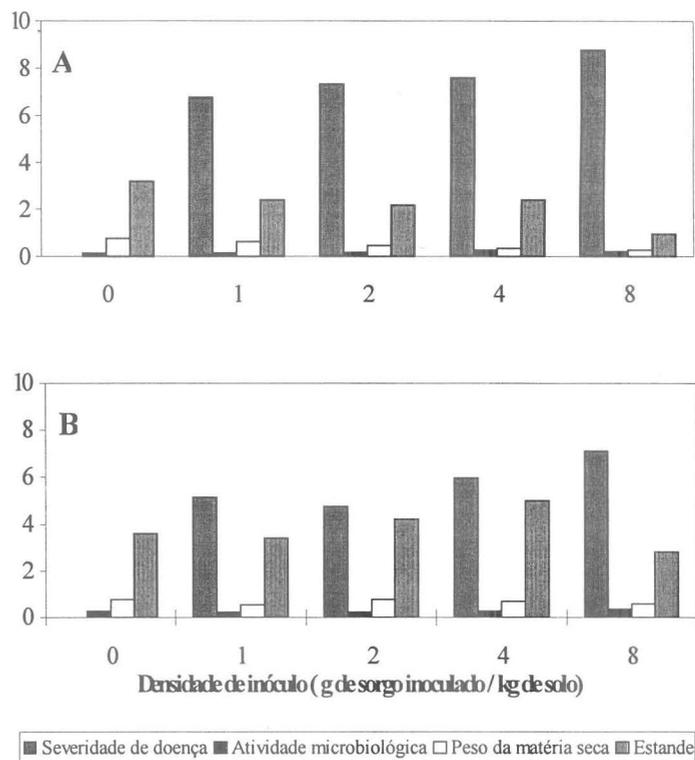


Figura 1. Severidade da podridão do colo (escala de 1 a 9), atividade microbiológica do solo (mg de fluoresceína diacetato hidrolisada/min/g), peso da matéria seca (gr) e estande (n° de plantas emergidas) do feijoeiro em resposta a diferentes densidades de inóculo em dois tipos de solo: (A) conducente e (B) supressivo.

Quadro 1 - Severidade da podridão do colo de feijoeiro, causada por *Sclerotium rolfsii*, cultivado em dois tipos de solo, em função do método de aplicação do inóculo.

Tratamentos	Severidade de doença		
	Micélio em sorgo	Escleródios na cova	Escleródios no solo
Solo conducente	7,2 a	5,2 a	6,5 a
Solo supressivo	5,3 b	5,1 a	3,1 b

Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade (Análise conjunta dos dados).

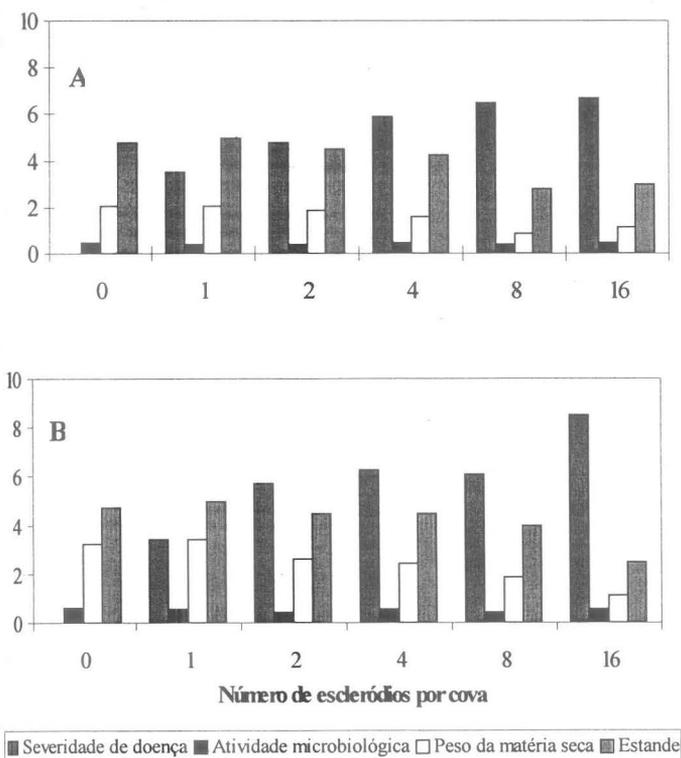


Figura 2. Severidade da podridão do colo (escala de 1 a 9), atividade microbiológica do solo (mg de fluoresceína diacetado hidrolisada /min/g), peso da matéria seca (gr) e estande (nº de plantas emergidas) do feijoeiro em resposta a diferentes densidades de inóculo em dois tipos de solo: (A) conducente e (B) supressivo.

Para inoculação dos escleródios na cova, o tipo de solo utilizado, conducente ou supressivo, não influenciou na severidade de doença (Quadro 1) e a atividade microbiológica determinada pela dehidrogenase de fluoresceína diacetato também não foi alterada em consequência da adição dos escleródios (Figura 2). Houve uma correlação positiva ($r=0,87$) entre a densidade de inóculo e a severidade de doença e uma correlação negativa entre densidade de inóculo e estande ($r=-0,86$) e matéria seca ($r=-0,91$). Com base nos resultados obtidos, com esse método de inoculação, a quantidade de inóculo necessária para causar a doença foi de duas unidades de escleródios por cova, e levou ao desenvolvimento dos sintomas

em condições idênticas a número de quatro e seis unidades e não foi influenciada pelo tipo de solo, provavelmente pelo fato do fungo entrar em contato diretamente com a semente durante o processo de germinação. Porém, os níveis de doença observados foram muito baixos, o que dificulta a separação dos genótipos quanto a tolerância ao patógeno (Quadro 2).

Quadro 2 - Reação de cultivares de feijoeiro a *Sclerotium rolfsii* adicionado ao solo através de sorgo colonizado com micélio e de escleródios. 1997.

Genótipos	Severidade de doença ¹	
	Micélio veiculado em sorgo ²	Escleródios por cova ³
Barriga-verde	6,1	2,1
Emgopa-ouro	6,0	1,6
Epaba 1	3,4	1,5
Ft-Tarumã	6,6	1,5
Ft-120	4,3	1,7
IAPAR 44	6,0	1,8
IAPAR-57	5,0	2,3
IAPAR-65	6,2	2,5
Ipa-7	9,0	2,3
Ipa-8	4,8	2,0
Ipa-9	9,0	3,0
Ipa-11	3,0 ⁴	2,9 ⁴
Iraí	7,2	5,5
Jalo EEP-558	4,5	6,1
Jalo Precoce	7,4	5,3
Macanudo	4,5	2,6
Macotaço	5,5	2,7
Mínuano	5,6	3,1
Novo Jalo	7,0	3,3
Ônix	3,6	1,7
Ouro Branco	3,9	2,5
São José	8,0	3,5
Varre-sai	4,5	1,8
Xamego	4,1	1,5
Xodó	2,1 ⁴	2,8 ⁴

¹Baseada em uma escala de notas de 1 a 9 onde, 1= ausência de sintomas e 9= plantas mortas. ²Micélio veiculado em sorgo na densidade de quatro gramas de inóculo por 1000 gramas de solo. ³Adição de dois escleródios por cova de plantio. ⁴Genótipos que foram capazes de retardar a expressão dos sintomas até 21 dias após o plantio.

Para escleródios incorporados ao solo supressivo, não foram observadas diferenças significativas para as densidades de inóculo utilizadas. O acúmulo de matéria seca e a população final de plantas não sofreram alteração com a densidade de inóculo. Para o solo conducente, ocorreram aumento da severidade da doença e diminuição da matéria seca e do estande à medida em que se aumentou a quantidade de inóculo. Em ambos os solos, a atividade microbiológica não foi alterada pela inoculação dos escleródios do fungo (Figura 3). O solo cultivado apresentou, de forma geral, uma maior severidade de doença quando este foi infestado tanto por sorgo colonizado pelo micélio como por escleródios (Quadro 1), o que confirma a elevada condutância deste ao patógeno.

A quantificação de danos, na abordagem tradicional, correlaciona a severidade da doença com a redução do estande. Os índices de severidade nos ensaios para a cultivar Rosinha foram crescentes com o aumento da densidade de inóculo.

Avaliação da reação de cultivares comerciais de feijoeiro à podridão do colo. Em casa de vegetação, para comparação dos métodos e eficiência dos mesmos, utilizou-se micélio veiculado em sorgo na densidade de quatro gramas de inóculo por kg de solo e dois escleródios colocados diretamente na cova. Os índices de severidade com inoculação de sorgo colonizados foram elevados e permitiram detectar diferenças na reação de resistência à podridão do colo incitada por *S. rolfisii* (Quadro 2). O método de adição de dois escleródios por cova de semeadura não permitiu separar genótipos, em função do baixo índice de severidade de doença (Quadro 2). As cultivares Xodó e Ipa-11 (Quadro 2), apresentaram índices de severidade menores em relação às demais, sendo capazes de retardar a expressão dos sintomas na planta até aos 21 dias após o plantio.

A confirmação de um método eficiente para avaliar o germoplasma do feijoeiro é importante para a agricultura brasileira, pois a podridão do colo incitada por este patógeno é causadora de sérios danos à cultura. Cultivares resistentes são medidas de controle mais desejáveis no mercado, devido ao seu baixo custo final para o produtor.

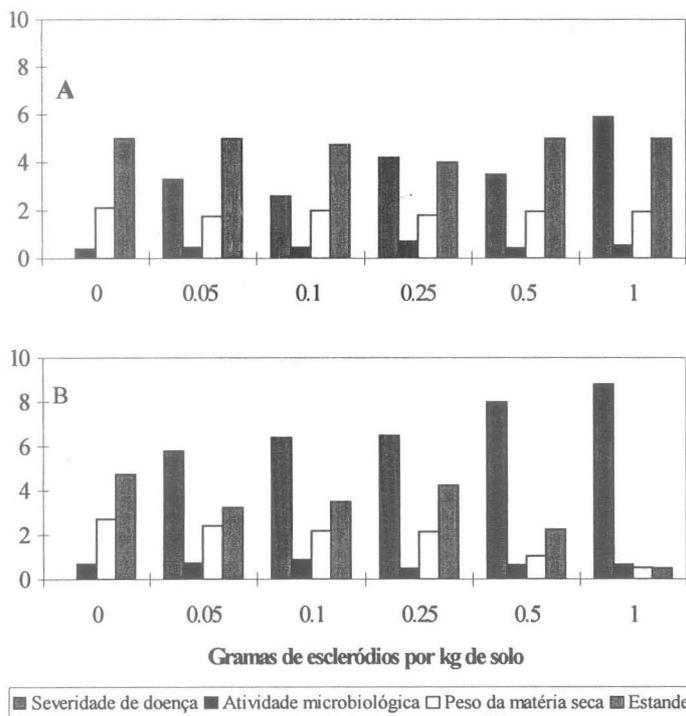


Figura 3. Severidade da podridão do colo (escala de 1 a 9), atividade microbiológica do solo (mg de fluoresceína diacetado hidrolisada /min/g), peso da matéria seca (gr) e estande (nº de plantas emergidas) do feijoeiro em resposta a diferentes densidades de inóculo em dois tipos de solo: (A) conducente e (B) supressivo.

01. AYCOCK, R. *Stem rot and other diseases caused by Sclerotium rolfisii*. Raleigh: North Carolina State University, 1966. 202p. (Technical Bulletin, 17).
02. BEUTE, M.K., RODRÍGUEZ-KABANA. Effects of soil moisture, temperature and field environment on survival of *Sclerotium rolfisii* in Alabama and North Carolina. *Phytopathology*, St. Paul, v.71, n.12, p.1293-1296, 1981.
03. CARDOSO, J.E. Podridões do colo. In: SARTORATO, A., RAVA, C.A. (Eds.). *Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle*. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.165-173. (EMBRAPA-CNPAP. Documentos, 50).
04. COSTA, J.L. da S. *Inducing Suppressiveness to Phytophthora Root Rot of Avocado by using Bioenhanced Mulches*. Riverside, 1995. 151p. Tese (Doutorado) – University of California.
05. FLADOS, N.D. Ecological factors affecting growth and formation of sclerotia in *Sclerotium rolfisii*. *Phytopathology*, St. Paul, v.48, p.342, 1958.
06. HERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Efecto de diferentes niveles de pH sobre *Sclerotium rolfisii*. *Ciencias de la Agricultura*, La Habana, n.29, p.20-23, 1986.
07. HERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A., GARCIA, C. *Evaluacion de variedades de frijol frente al hongo Sclerotium rolfisii*. Provincia Granma: Instituto de Investigaciones Agropecuarias/Academia de Ciências de Cuba, 1988.
08. MINISTERIO DE LA AGRICULTURA (La Habana, Cuba). *Instructivo técnico para el cultivo del frijol*. La Habana, 1984. 69p.
09. PELCZAR, M.J., REID, R.D. *Microbiología*. Madrid: Del Castillo, 1976. 644p.
10. PÉREZ SENDÍN, M.A., GONZÁLEZ BARRIOS, J. Incidência de las enfermedades producidas por los hongos del suelo en zonas de producción de frijol en Cuba. *Ciencias de la Agricultura*. La Habana, v.29, p.28-33, 1986.
11. PÉREZ-SENDÍN, M.A., GONZÁLEZ-BARRIOS, J., MORALES-GONZALEZ, N. Viabilidad de esclerocios de *Sclerotium rolfisii* en suelos productores de frijol en Cuba. *Ciencias de la Agricultura*, La Habana, v.39, p.29-32, 1990.
12. PUNJA, K.Z., GROGAN, R.G. Eruptive germination of sclerotia of *Sclerotium rolfisii*. *Phytopathology*, St. Paul, v.71, p.1092-1099, 1981.
13. PUNJA, Z.K. The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfisii*. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.23, p.97-127, 1985.
14. SCHOONHOVEN, A. Van, PASTOR-CORRALES, M.A. (Eds.). *Standard system for the evaluation of bean germplasm*. Cali: CIAT, 1987. 54p.