

Avaliação de Métodos de Inoculação Artificial e Caracterização de Cultivares de Feijoeiro Comum Quanto à Reação ao Mofo Branco

Lenio Urzeda Ferreira¹, Thiago Lívio P. O. de Souza^{2*}, Murillo Lobo Júnior³, Helton Santos Pereira⁴, Leonardo Cunha Melo⁵, Luís Cláudio de Faria⁶, Adriane Wendland⁷, Victor Alves Ribeiro⁸, Patrícia G. Santos Melo⁹

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes métodos de inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijoeiro comum, bem como avaliar a reação de cultivares carioca quanto à reação ao mofo branco. Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente ao acaso, com quatro repetições, para cada método de inoculação. Cinco cultivares e uma linhagem testemunha foram inoculadas utilizando-se seis métodos distintos: chumaço de algodão (CA), teste do canudo (TC), flor infectada em planta intacta (FIPI), disco BDA em planta intacta (BDAPI), disco BDA em folha destacada (BDAFD) e flor infectada em folha destacada (FIFD). Em todos os ensaios foi utilizado o isolado do patógeno “SS 1370”, altamente agressivo. Foram adotados como critérios de qualificação dos métodos: o coeficiente de variação experimental, desvio-padrão, *p*-valor referente ao teste de Bartlett para homocedasticidade e a razão de sensibilidade (RS). Observou-se que os menores valores para os coeficientes de variação (CV) foram obtidos pelos métodos BDAFD e FIFD. Quanto ao desvio-padrão, notou-se que os menores valores foram observados nos métodos FIFD, BDAFD e TC. O método CA apresentou ainda, a menor magnitude do *p*-valor em relação ao teste de homogeneidade de variância. De acordo com a razão de sensibilidade, todos os métodos foram inferiores ao método do canudo (TC), evidenciando que este método é o mais indicado para a realização de ensaios que têm por finalidade a discriminação de genótipos quanto à reação ao mofo branco. As cultivares BRS Cometa e BRS Estilo, além da linhagem testemunha CNFC 9500, apresentaram menores médias de reação ao fungo *S. sclerotiorum* considerando todos os métodos avaliados, e portanto apresentam potencial para serem utilizadas como genitores na formação de populações base visando ao desenvolvimento de cultivares resistentes.

Introdução

A ocorrência de doenças está entre os principais fatores responsáveis pela redução da produtividade e aumento de custos de produção na cultura do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). A podridão branca da haste, mais popularmente conhecida como mofo branco, incitada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, é considerada como uma das doenças mais destrutivas nesta cultura (Paula Jr, 2008). Em condições favoráveis, a cultura pode sofrer perdas de 30% a 100% na ausência de medidas de controle (Oliveira, 2005). Portanto, a utilização de cultivares resistentes tem sido uma alternativa altamente demandada, com potencial de contribuir sobremaneira com o manejo integrado da doença, reduzindo custos e riscos diversos associados à produção.

A resistência do feijoeiro comum ao mofo branco apresenta herança complexa, sendo composta por resistência genética e mecanismos de escape (Kolkman & Kelly, 2002). Os progressos do melhoramento genético visando à resistência ao mofo branco têm sido dificultados pela expressividade da resistência genética e pelo emprego de métodos de inoculação ineficientes, bem como pela influência do ambiente na variabilidade dos mecanismos de escape. Não há referências sólidas acerca da qualidade de métodos de inoculação de

¹ Mestrando no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas – UFG/Goiânia. Bolsista da CAPES. E-mail: leniourzeda@gmail.com

² Pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás. E-mail: thiago.souza@embrapa.br

³ Pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO. E-mail: murillo.lopez@embrapa.br

⁴ Pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO. E-mail: helton.pereira@embrapa.br

⁵ Pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO. E-mail: leonardo.melo@embrapa.br

⁶ Pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO. E-mail: luis.faria@embrapa.br

⁷ Pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO. E-mail: adriane.wendland@embrapa.br

⁸ Mestrando no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas – UFG/Goiânia. victor.alvesribeiro@yahoo.com.br

⁹ Professora Associada - Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia. E-mail: pgsantos@gmail.com

*Autor para correspondência

S. sclerotiorum em feijoeiro comum para condições tropicais, assim como também não há indicações de métodos superiores quanto à capacidade de discriminação de genótipos visando sua caracterização quanto à reação ao mofo branco nestas condições. A determinação e adoção de métodos eficientes de inoculação são imprescindíveis para a identificação de potenciais fontes de resistência e conseguinte utilização efetiva destas em programas de melhoramento. Portanto, objetivou-se avaliar e qualificar diferentes métodos de inoculação artificial com o fungo *S. sclerotiorum* em feijoeiro comum e eleger aquele de maior mérito técnico, bem como avaliar a reação ao mofo branco de cultivares carioca com base nos diferentes métodos testados.

Material e Métodos

Foram utilizados seis métodos de inoculação em cinco cultivares e uma linhagem testemunha de feijoeiro. Em todos os ensaios, os genótipos inoculados foram: BRS Requite, BRSMG Madrepérola, BRS Cometa, Pérola, BRS Estilo e CNFC 9500. Os ensaios foram conduzidos, para cada método, em delineamento inteiramente ao acaso, com quatro repetições. Os métodos de inoculação utilizados foram: chumaço de algodão (CA), teste do canudo (TA), flor infectada em planta intacta (FIPI), disco BDA (Batata, Dextrose e Ágar) em planta intacta (BDAPI), disco BDA em folha destacada (BDAFD) e flor infectada em folha destacada (FIFD). Em todos os ensaios foi utilizado o isolado de *S. sclerotiorum* SS 1370, considerado como padrão de agressividade na coleção de fitopatógenos mantida pelo Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO.

O método CA foi realizado conforme descrito por Bastien et al. (2012), sendo, contudo, adaptado para o feijoeiro. O TC foi realizado conforme Petzoldt & Dickson (1996), com modificações propostas por Terán et al. (2006). A inoculação mediante o método FIPI foi realizada de acordo com Schwartz et al. (1978). O método de inoculação utilizando disco BDA em folhas destacadas (BDAFD) foi realizado conforme sugerido por Leone & Tonneijck (1990).

As inoculações utilizando o método BDAPI foram realizadas em plantas no estádio V6. Foram usados discos de 2,0 mm contendo micélio, os quais foram posicionados sobre três folíolos por planta, estas foram então mantidas em casa de vegetação por oito dias. Após esse período, mensurou-se o diâmetro de cada lesão com o auxílio de um paquímetro. O método FIFD foi realizado utilizando-se folhas de plantas em estágio R2. Foram coletadas flores maduras e colocadas sobre meio BDA com micélio crescido por 72 h. Após 48 h, estas flores infectadas foram posicionadas sobre folhas destacadas acomodadas em placas de Petri. Nos métodos BDAFD e FIFD, após a inoculação, as placas foram mantidas em B.O.D. sob a temperatura de 21,5°C, UR de 90% e fotoperíodo de 12 h. Após 48 e 72 h, foram medidos os diâmetros das lesões com o auxílio de um paquímetro. Nos demais métodos, as plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação, a 28°C e UR >80%, sendo que as avaliações foram realizadas aos oito dias após a inoculação.

Para a análise dos resultados, foram calculadas as AACPD (área abaixo da curva de progresso da doença) e realizada a transformação Log (x) para os métodos BDAFD e FIFD. Adotou-se como critérios de qualificação dos métodos: o coeficiente de variação experimental (CV), desvio-padrão, *p*-valor referente ao teste de Bartlett para homocedasticidade e a razão de sensibilidade (RS) conforme sugerido por Otto-Hanson et al. (2009). A razão de sensibilidade foi calculada conforme a seguinte equação:

$$RS (M/N) = |dM/dN| / (\sigma_M / \sigma_N)$$

Em que,

M e N são dois métodos de inoculação;

|dM/dN| é o coeficiente angular obtido pela regressão de N em M;

σ_M e σ_N são os desvios-padrão obtidos associados aos métodos M e N, respectivamente.

Todos os métodos foram comparados ao teste do canudo, mediante a estimativa do RS, por ser este o método mais utilizado atualmente, visto a sua popularidade e praticidade. Para a estimativa do RS, assumiu-se que há uma relação linear entre M e N. Foi utilizada a raiz do quadrado médio do resíduo (QMR) como estimador dos desvios-padrão. Admitiu-se ainda, que a distribuição de RS se ajusta a uma distribuição F de Snedecor. Portanto, considerou-se que: se $RS (M/N) > 1$, o método M é superior a N. Se $RS (M/N) < 1$, o método N é superior. Caso o $RS (M/N) = 1$, os métodos são equivalentes.

Foi aplicado o teste de Scott-Knott a 5% de significância para o agrupamento das médias referentes às respostas dos genótipos em cada método de inoculação. Neste caso, também foram utilizados os valores de AACPD, transformados por Log (x), para os métodos BDAFD e FIFD.

Resultados e Discussão

Observaram-se menores coeficientes de variação (CV) nos métodos BDAFD e FIFD, seguidos por BDAPI, FIPI, TC, CA, respectivamente (Tabela 1). Kull et al. (2003) obtiveram maiores CVs para o método da folha destacada, seguido pelo método do corte em haste. Otto-Hanson et al. (2009) obtiveram CV de 25% e 35% para o método da folha destacada e o método do canudo, respectivamente. Quanto à magnitude dos desvios-padrão, notou-se que os menores valores foram observados nos métodos FIFD, BDAFD e TC. Os métodos BDAPI, FIPI e CA apresentaram valores superiores, sendo que o método CA apresentou o maior valor entre eles. O CV e o desvio-padrão são medidas dependentes da escala, sendo, portanto, influenciadas pela magnitude das notas ou medidas que são atribuídas às observações. Ainda que tais medidas sejam indicadores importantes quanto à qualidade experimental, não possibilitam uma comparação eficiente quanto à qualidade dos métodos.

O método CA apresentou a menor magnitude para o *p*-valor em relação ao teste de homogeneidade de variância, isso sugere menor qualidade deste método em detrimento aos demais. A homogeneidade dos erros associados aos diferentes genótipos é de considerável importância em uma análise de variância, sobretudo em relação à comparação de médias. Visto que, neste caso, assume-se uma variação residual comum a todos os genótipos. Geralmente, um teste F realizado nestas condições, tende a não rejeitar a hipótese de nulidade quando falsa (Scheffé, 1959) (Tabela 1).

Tabela 1. Coeficientes de variação experimental, desvios-padrão e *p*-valores associados ao teste de Bartlett relacionados aos diferentes métodos de inoculação artificial de *S. sclerotiorum* em feijoeiro comum.

Métodos de inoculação ¹	Coeficientes de variação	Desvios-padrão ²	Teste de Bartlett (<i>p</i> -valores) ³
CA	52,65922	30,45919	0,0287
TC	11,69268	0,6236096	0,8405
FIPI	9,325659	4,361883	0,4099
BDAPI	23,47423	4,220275	0,2529
BDAFD	5,690852	0,3295036	0,5003
FIFD	5,224097	0,1142608	0,2154

¹CA: chumaço de algodão; TC: teste do canudo; BDAPI: disco BDA em planta intacta; BDAFD: disco BDA em folha destacada e FIFD: flor infectada em folha destacada;

²Valores de desvios-padrão estimados pela raiz do Quadrado Médio Residual de cada métodos;

³Hipótese de nulidade refere-se ao ajuste dos dados à homocedasticidade.

Os coeficientes angulares, obtidos pela regressão entre o método TC e demais métodos, foram significativos e positivos para FIPI, BDAPI e FIFD. Entretanto, não foram observados coeficientes angulares significativos quando se realizou a regressão entre os métodos CA e BDAFD em TC (Tabela 2). Isso pode ser decorrente do elevado erro experimental associado aos ensaios, ou ainda, resultante da baixa ou inexistente relação linear entre os métodos.

Tabela 2. Coeficientes angulares obtidos pela regressão de N em M (respectivamente, o método do canudo e os demais métodos de inoculação) no teste de razão de sensibilidade.

Métodos de inoculação ¹	Coeficiente angular				
	CA ^M	FIPI	BDAPI	BDAFD	FIFD
TC ^N	0,3385759 ^{ns}	4,852468**	2,096804*	0,001913373 ^{ns}	0,07615154**

¹CA: chumaço de algodão; TC: teste do canudo; BDAPI: disco BDA em planta intacta; BDAFD: disco BDA em folha destacada e FIFD: flor infectada em folha destacada;

**valores de RS significativamente menores que um (RS<1), conforme o teste F a 1% de significância, * menores que 1 a 5% de significância e ^{ns}, não significativo a 5% de significância.

Constatou-se, mediante a estimativa da razão de sensibilidade, que todos os métodos foram inferiores ao método do canudo (TC), visto que estes apresentaram valores estimados de RS significativamente inferiores a um ($RS < 1$) em relação ao TC (Tabela 3). Entretanto, devido ao ajuste linear não significativo de TC em CA e BDAFD, não se pode afirmar que estes métodos apresentam mérito técnico inferior ao TC. Kull et al. (2003) também evidenciaram a superioridade do método TC, embasando-se na mesma análise, quando comparado com o método da inoculação em cotilédone e em folha destacada.

Tabela 3. Estimativas da razão de sensibilidade entre os métodos M e N.

Métodos de inoculação ¹	Razão de sensibilidade (RS)				
	CA ^M	FIPI	BDAPI	BDAFD	FIFD
TC ^N	0,06931871**	0,6937476*	0,3098345**	0,003621198**	0,4156179**

¹CA: chumaço de algodão; TC: teste do canudo; BDAPI: disco BDA em planta intacta; BDAFD: disco BDA em folha destacada e FIFD: flor infectada em folha destacada;

**valores de RS significativamente menores que um ($RS < 1$), conforme o teste F a 1% de significância e * menores que 1 a 5% de significância.

Aplicando-se o teste de agrupamento de médias, observou-se que no método CA somente a cultivar BRS Estilo distinguiu-se das demais, apresentando a menor média quanto à reação ao *S. sclerotiorum*. No método TC, nota-se que BRS Cometa e a linhagem CNFC 9500 diferiram das demais, apresentando as menores médias. No caso do método FIPI, BRS Cometa e CNFC 9500 apresentaram as menores médias, seguidos por BRS Estilo e Pérola, os quais apresentaram valores intermediários, e BRS Requite e BRSMG Madrepérola, que apresentaram os maiores valores médios de reação. No método BDAPI, as cultivares BRS Cometa, BRS Estilo e a linhagem CNFC 9500 apresentaram as menores médias, seguidas por Pérola e BRSMG Madre Pérola, com valores intermediários, e BRS Requite, com a maior média. No método BDAFD, a linhagem BRS Requite apresentou a maior média, diferindo-se das demais. No método FIFD, BRS Cometa e CNFC 9500 apresentaram os menores valores médios de reação, seguidas por Pérola, que apresentou resposta intermediária, e BRSMG Madrepérola, BRS Estilo e BRS Requite, que apresentaram as maiores médias.

Tabela 5. Médias das reações de cultivares carioca de feijoeiro ao mofo branco quando testadas utilizando diferentes métodos de inoculação artificial.

Genótipos	Métodos de inoculação ¹					
	CA	TC	FIPI	BDAPI	BDAFD	FIFD
BRS Madre Pérola	87,7400 a ²	6,75 a	59,2425 a	20,6250 b	5,602667 b	7,124536 a
Pérola	78,4650 a	6,50 a	48,8425 b	22,5375 b	5,596440 b	6,881613 b
BRS Requite	62,8775 a	6,50 a	61,9175 a	35,8475 a	6,358909 a	7,201159 a
BRS Cometa	54,9575 a	2,25 b	28,3275 c	11,1500 c	5,844845 b	6,697365 c
BRS Estilo	15,6350 b	7,25 a	46,9200 b	8,26500 c	5,640414 b	6,992943 a
CNFC 9500 ³	47,3775 a	2,75 b	35,3875 c	9,44500 c	5,697073 b	6,687025 c

¹CA: chumaço de algodão (comprimento de lesão); TC: teste do canudo (nota 1-9); BDAPI: disco BDA em planta intacta (diâmetro de lesão); BDAFD: disco BDA em folha destacada e FIFD: flor infectada em folha destacada (Log (diâmetro de lesão));

²Valores seguidos por letras diferentes, em cada método, diferem entre si conforme o teste de Scott-Knott a 5% de significância;

³Testemunha resistente (resistência em condição de campo).

As variações observadas na ordenação dos genótipos dentre os métodos de inoculação são decorrentes da interação entre os genótipos e métodos e, ou, dos erros associados a cada método. Tal interação pode ser advinda do procedimento de manipulação do patógeno em cada método, tecido inoculado, idade ontogenética do vegetal, tempos entre a inoculação e avaliação. Entretanto, é possível que cada método de inoculação esteja associado a um mecanismo distinto de resposta do hospedeiro, fato que também pode explicar tais variações.

Dentre os métodos avaliados, o método TC é o mais indicado para a realização de ensaios que têm por finalidade a discriminação de genótipos quanto à reação ao fungo *S. sclerotiorum*. Diante dos critérios adotados, este método apresentou o maior mérito técnico. As cultivares BRS Cometa e BRS Estilo, além da linhagem testemunha CNFC 9500, apresentaram um melhores menores médias quanto à resposta a *S.*

sclerotiorum considerando-se os métodos avaliados, portanto apresentam potencial para serem utilizadas como genitores em programas de melhoramento que buscam reação de resistência a *S. sclerotiorum*.

Agradecimentos

À Embrapa Arroz e Feijão, por oportunizar a realização do presente trabalho, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo indispensável apoio financeiro.

Referências

- Bastien M et al. (2012) A reproducible assay for measuring partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Canadian Journal of Plant Science** 2: 279-288.
- Kolkman JM and Kelly JD (2002) Agronomic traits affecting resistance to white mold in common bean. **Crop Science** 3: 693-699.
- Kull LS et al. (2003) Evaluation of resistance screening methods for *Sclerotinia* stem rot of soybean and dry bean. **Plant Disease** 12: 1471-1476.
- Leone G and Tonnejck A (1990) A rapid procedure for screening the resistance of bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. **Euphytica** 1: 87-90.
- Oliveira F. (2005) Manejo do mofo branco. **Revista DBO Agrotecnologia** 4: 8-13.
- Otto-Hanson et al. (2009) The Sensitivity Ratio: A Superior Method to Compare Plant and Pathogen Screening Tests. **Crop Science** 1: 153-160.
- Paula Júnior T (2008) Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central brasileira: 2007-2009. **Epamig Série Documentos** 42: 180p.
- Petzoldt R and Dickson M (1996) Straw test for resistance to white mold in beans. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative** 39: 142-143.
- Scheffé H (1959) **The analysis of variance**. New York. J. Wiley: 479p.
- Schwartz H et al. (1978) Influence of *Phaseolus vulgaris* blossoming characteristics and canopy structure upon reaction to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology** 3: 465-470.
- Terán et al. (2006) Modified Petzoldt and Dickson scale for white mold rating of common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative** 49: 142-143.