

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**

**REAÇÃO DE ESPÉCIES DE CROTALÁRIA À**  
*Sclerotinia sclerotiorum* e *Meloidogyne javanica*

**BRUNO CEZAR ALVARO PONTIM**

**DOURADOS**  
**MATO GROSSO DO SUL**  
**2017**

**REAÇÃO DE ESPÉCIES DE CROTALÁRIA À**  
*Sclerotinia sclerotiorum e Meloidogyne javanica*

**BRUNO CEZAR ALVARO PONTIM**

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Ph.D. WALBER LUIZ GAVASSONI

Co-Orientadora: Profa. Dra. LILIAN MARIA ARRUDA BACCHI

Co-Orientador: Prof. Dr. MILTON PARRON PADOVAN

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

Dourados  
Mato Grosso do Sul  
2017

**REAÇÃO DE ESPÉCIES DE CROTALÁRIA À**  
***Sclerotinia sclerotiorum* e *Meloidogyne javanica*.**

por

Bruno Cezar Alvaro Pontim

Tese apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de  
DOUTOR EM AGRONOMIA

Aprovada em: 07/03/2017

---

Prof. Ph. D. Walber Luiz Gavassoni  
Orientador – UFGD/FCA

---

Dra. Cláudia de Souza Zanella  
UEMS

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Marlene Estevão Marchetti  
UFGD

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Cácia Leila T. P. Viana  
UNIGRAN

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Silvia Correa dos Santos  
UFGD/FCA

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

P816r Pontim, Bruno Cezar Alvaro

REAÇÃO DE ESPÉCIES DE CROTALÁRIA À *Sclerotinia sclerotiorum* e  
*Meloidogyne javanica* / Bruno Cezar Alvaro Pontim -- Dourados: UFGD, 2017.  
85f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Walber Luiz Gavassoni

Co-orientadora: Lillian Maria Arruda Bacchi

Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias,  
Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. *Crotalaria* spp.. 2. Mofo branco. 3. Meloidoginoses. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

*In Memoriam*

Às minhas avós

Ana Encarnação Pontim

Joaquina Gil Alvaro

Ao Meu Bom Deus.

Aos Meus Pais, Irmãos e Amigos.

Dedico e Ofereço!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, minha gratidão, por ter me permitido superar os momentos difíceis e concluir este trabalho.

Aos meus pais, João Pontim e Lucia de Fátima Gil Álvaro Pontim e meus irmãos, João Pedro e Tatiana, pelo incentivo e compreensão nos momentos difíceis. À Marineusa Cordeiro de Oliveira, ao meu afilhado Pedro e comadre Joelma pelo incentivo. À Menara Manfré, por sempre estar ao meu lado, me ajudando e dando força.

Aos professores que passaram durante toda minha vida, em especial à Prof<sup>a</sup> Benedita, Novo Horizonte do Sul; Prof.<sup>a</sup> Dirce Vani, de Ivinhema MS; Prof Reinaldo, Etec. Dr. Luiz César Couto de Quatá; Prof. Dr.Nestor Heredia Zarate; ao Prof. Dr. Walber Luiz Gavassoni, pela orientação, incentivos, conselhos, sobretudo pela amizade e compreensão; à Prof.<sup>a</sup> Dra. Lilian Maria Arruda Bacchi co-orientadora pelos ensinamentos e ajuda durante o desenvolvimento do trabalho; ao Prof. Dr. Milton Padovan co-orientador, pela ajuda e por ceder parte do material da pesquisa e ao Prof. Dr. Luis Del Rio Mendoza por todos os ensinamentos compartilhados, pela amizade, pela diversão por ele proporcionado e por tudo que fez por mim.

Aos amigos Dr. Kishore Chittem, Dr. Seyed Mojtaba Mansouripour e a Claudia Munoz Rejas, pela amizade e pelo tempo que tiveram disponíveis para me ajudar, nos momentos de trabalho e diversão que tivemos. Aos amigos Gazala Ameen, Shyam Singh Solanki, Subidhya Shrestha, Wrosan Sharma, Gayan Kanishka Kariyawasam, Chris Misar, Rethesh Krishnan, Vinny Antony, Aziz Şatana, Gabriel Eronmosele, Johanna Lukaschewsky, Osvaldo Teuber Winkler e Juan Franco que puderam compartilhar comigo suas experiências a na integração dentro da NDSU. A técnica do Laboratório de Doenças da Canola Susan Ruud, pela ajuda. Aos amigos, Renata Jung, Wellington Souto Ribeiro, Flávia Silvestre Alves, Lucilene Oliveira e Clayton Miranda, pela ajuda e amizade.

À Universidade Federal da Grande Dourados por ter concedido horário especial e em um período, afastamento do trabalho, podendo assim continuar com meus estudos.

Aos acadêmicos, intercambistas do Projeto MARCA, Lucila Maria Kohan, Rodolfo Alejandro Molletones, Orlando Villegas Cazón, por toda ajuda que ofereceram no desenvolvimento dos trabalhos durante a estadia aqui dentro da UFGD.

Aos amigos Cassia de Carvalho, Paulo Henrique Nascimento, Carlos Reinier Garcia Cardoso, Lorraine Venâncio, Karina Maraschi, Nadine Escarmanhani Padovan, Jefferson Barizon, Rodrigo Arakawa, Daniel Luan Espindola, Marina Syrio, Nathalia Marinho, Renan Miranda Viero, Anderson Dias, Pedro Comparini, Antonio Souza, Gabriela Piñeyro, Jerusa Rech, Suelen Pieta e Gabrielli Maia, pela ajuda em algumas das fases do desenvolvimento do trabalho.

Em especial a Cassia de Carvalho e Paulo Henrique Nascimento que muito colaboraram na administração das atividades do laboratório durante o tempo que estive ausente.

À todos os colegas e amigos da Associação de Engenheiros Agrônomos da Grande Dourados e do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia, pelo companheirismo e ajuda durante todo esse tempo de convívio.

Aos demais amigos que sempre me incentivaram nesta caminhada.

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

Bruno Cezar Álvaro Pontim, nascido em 30 de dezembro de 1984, no município de Paranaíba-PR, filho de João Pontim e Lucia de Fátima Gil Alvaro Pontim. Em 1996 entrou na Escola Municipal Rural Benedita Figueiró de Oliveira - Colégio Agrícola de Pré-Qualificação em Agropecuária no município de Ivinhema/MS, para cursar o 5º ano do ensino fundamental, onde ficou até 1999. No ano de 2000, através processo seletivo “vestibulinho”, ingressou na Etec. Dr. Luiz César Couto do Centro Estadual Educação Tecnológica Paula Souza - SP, onde se formou em Técnico em Pecuária e também em Técnico em Açúcar e Alcool.

No ano de 2003, ingressou no curso de agronomia na UFMS, campus Dourados, hoje Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD onde foi bolsista de iniciação científica pela Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul – FUNDECT, durante dois anos. No ano de 2006 ingressou, através de concurso público, no Laboratório de Fitopatologia da Faculdade de Ciências Agrárias, como Técnico em Fitopatologia. Foi diplomado em Engenheiro Agrônomo em março de 2009.

Em Março de 2009, ingressou no curso de mestrado em Agronomia (Área de Concentração em Produção Vegetal), na Universidade Federal da Grande Dourados, submetendo-se a defesa da dissertação em agosto de 2011. No final do ano de 2012, submeteu-se ao processo seletivo para o doutorado em Agronomia, na mesma instituição, sendo aprovado em primeiro lugar.



## SUMÁRIO

	PÁGINA
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	6
CAPÍTULO I .....	9
REAÇÃO DE CROTALÁRIA A <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	9
RESUMO.....	9
ABSTRACT: .....	10
INTRODUÇÃO .....	11
MATERIAL E MÉTODOS .....	14
Multiplicação das espécies de crotalária.....	14
Reação de espécies de crotalária a <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	14
Avaliação da metodologia de inoculação com flores colonizadas .....	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	21
Reação pelo método do palito.....	21
Avaliação da metodologia de inoculação com flores colonizadas .....	30
CONCLUSÕES .....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	36
CAPÍTULO II.....	41
EFICIÊNCIA DE DIFERENTES ESPÉCIES DE CROTALÁRIA NO CONTROLE DE <i>Meloidogyne javanica</i> .....	41
RESUMO:.....	41
ABSTRACT: .....	42
INTRODUÇÃO .....	43
MATERIAL E MÉTODOS .....	45
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	50
CONCLUSÕES .....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	65
ANEXO I.....	66

## LISTA DE QUADROS

### CAPÍTULO I - REAÇÃO DE CROTALÁRIA A *Sclerotinia sclerotiorum*

PÁGINA

- QUADRO 1. Incidência de plantas com lesão (%), índice de doença McKinney, área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD), massa de escleródios e plantas mortas (%) em espécies de crotalária inoculadas com *S. sclerotiorum*, primeiro ensaio. Dourados, MS, 2017..... 21
- QUADRO 2. Massa seca (MS) de folha, massa seca de caule e massa seca da soma das folhas com os caules, em espécies de crotalária submetidas à inoculação com *S. sclerotiorum*, primeiro ensaio. Dourados, MS, 2017..... 24
- QUADRO 3. Incidência de plantas com lesão (%), índice de doença McKinney, área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD), massa de escleródios e plantas mortas (%) em espécies de crotalária inoculadas com *S. sclerotiorum*, segundo ensaio. Dourados, MS, 2017..... 26
- QUADRO 4. Área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD), porcentagem mortalidade (%) em espécies de crotalária inoculadas com *S. sclerotiorum*, terceiro ensaio. Dourados, MS, 2017..... 27
- QUADRO 5. Plantas com escleródios (%), massa de escleródios (g), número de escleródios, massa por escleródio e número de escleródio por planta em espécies de Crotalária inoculadas com *S. sclerotiorum*, terceiro ensaio. Dourados, MS, 2017..... 28
- QUADRO 6. Área foliar lesionada (%), em folhas destacadas e inoculadas com flores, em função do tempo de exposição das flores a *S. sclerotiorum* e com disco de micélio, nas faces abaxial e adaxial das folhas. Dourados, MS, 2017..... 31
- QUADRO 7. Área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD) e massa de escleródios, em folhas destacadas e inoculadas com flores, em função do tempo de exposição das flores a *S. sclerotiorum* e com disco de micélio, nas fases abaxial e adaxial das folhas. Dourados, MS, 2017..... 32

### CAPÍTULO II. EFICIÊNCIA DE DIFERENTES ESPÉCIES DE CROTALÁRIA NO CONTROLE DE *Meloidogyne javanica*

- QUADRO 1. Massa de raízes, ovos por grama de raízes e fator de reprodução em diferentes espécies de crotalária no controle de *Meloidogyne javanica*. Dourados, MS, 2017..... 50

- QUADRO 2. Massa fresca de raízes de tomateiro, número de ovos por grama de raízes e J2 por grama de raízes segundo ensaio do experimento de diferentes espécies de crotalária no controle de *Meloidogyne javanica*, em sucessão com tomate cultivar Santa Cruz Dourados, MS, 2017..... 51
- QUADRO 3. Número de ovos e J2 extraído de solo experimental, no primeiro ensaio do experimento de diferentes espécies de crotalária no controle de *Meloidogyne javanica* em sucessão com tomate cultivar Santa Cruz. Dourados, MS, 2017..... 52
- QUADRO 4. Massa de raiz, J2 por grama de raiz, ovos por grama de raiz e fator de reprodução no terceiro ensaio de diferentes espécies de crotalária aos 60 dias da inoculação com *Meloidogyne javanica*. Dourados, MS, 2017..... 53
- QUADRO 5. Massa de raiz, número de J2, número de fêmeas e índice de fêmeas em diferentes espécies de crotalária e tomateiro 45 dias após a inoculação de *Meloidogyne javanica*. Dourados, MS, 2017..... 54

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I - REAÇÃO DE CROTALÁRIA A *Sclerotinia sclerotiorum*

	PÁGINA
FIGURA 1. Planta de <i>Crotalaria spectabilis</i> inoculada com <i>S. sclerotiorum</i> pelo método do palito. Dourados, 2017.....	16
FIGURA 2. Flores de <i>C. anagyroides</i> com diferentes tempos de exposição ao inóculo (EI) e colônias <i>S. sclerotiorum</i> com quatro dias de incubação, de onde foram retirados os discos de micélio utilizados para a inoculação das folhas destacadas. Dourados, MS, 2017.....	18
FIGURA 3. Folhas destacadas inoculadas com flores em diferentes tempos de exposição ao inóculo (EI), com disco de micélio e testemunha. Dourados, MS, 2017.....	19
FIGURA 4. Escala diagramática para avaliação de sintomas de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em folíolo de soja (GARCIA e JULIATTI, 2012).....	16
FIGURA 5. <i>Crotalaria grahamiana</i> apresentando ruptura do caule em função do ataque da <i>S. Sclerotiorum</i> e emissão de brotos laterais. Dourados, MS, 2017.....	23
FIGURA 6. A. Temperatura máxima (parte superior da figura) e temperatura mínima (inferior da figura). B. temperatura média 17 dias após a inoculação dos três ensaios. Dourados, MS, 2017.....	26
FIGURA 7. Sintomas e sinais em diferentes espécies de crotalária inoculadas com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . A. <i>C. incana</i> , B., <i>C. C. grahamiana</i> , D., E. <i>C. juncea</i> , F., G. <i>C. paulina</i> e H., I. <i>C. spectabilis</i> . Dourados, MS, 2017.....	29

### CAPÍTULO II. EFICIÊNCIA DE DIFERENTES ESPÉCIES DE CROTALÁRIA NO CONTROLE DE *Meloidogyne javanica*

FIGURA 1. a. Preparo do inóculo de <i>Meloidogyne javanica</i> , b. c. inoculação dos tratamentos e acondicionamentos, d. raízes das espécies para extração, e. coloração dos ovos. Dourados, MS, 2017.....	44
FIGURA 2. Fêmea de <i>Meloidogyne javanica</i> em raiz de tomate, J2 de <i>Meloidogyne javanica</i> em raiz de crotalária. Dourados, MS, 2017....	55

## ANEXO I

- FIGURA 1. Diferentes espécies de crotalária utilizadas nos ensaios. **a.** *C. juncea*, **b.** *C. breviflora*, **c.** *C. incana*. **d.** *C. ochroleuca*, **e.** *C. spectabilis*, **f.** *C. paulina*. Dourados, MS, 2017..... 66
- FIGURA 2. Diferentes espécies de crotalária utilizadas nos ensaios. **a.** *C. anagyroides*, **b.** *C. grahamiana*, **c.** *C. lanceolata*. **d.** *C. pallida*. Dourados 2017..... 67

## REAÇÃO DE ESPÉCIES DE CROTALÁRIA À *Sclerotinia sclerotiorum* e *Meloidogyne javanica*

### RESUMO:

O uso de plantas como as crotalárias aumenta a adição de matéria orgânica do solo que pode estimular o desenvolvimento de uma microflora antagônica, que propicia o controle biológico dos nematóides além de produzirem alcaloides que apresentam alta toxicidade para estes fitoparasitas. No entanto, a escolha da espécie de planta a ser utilizada em rotação de cultura é de suma importância, pois da mesma forma que pode afetar supressão sobre a população de um patógeno, pode resultar em aumento no potencial de inóculo de outros. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a reação à *Sclerotinia sclerotiorum* e eficiência no controle de nematoide das galhas em condições controladas em Dourados Mato Grosso do Sul, para o qual foram instalados diversos experimentos. Para a avaliação da reação de diferentes espécies de Crotalária a *Sclerotinia sclerotiorum*. Diferentes espécies foram inoculadas com *S. sclerotiorum* pelo método do palito com micélio. Avaliou-se incidência das plantas sintomáticas, severidade, área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), massa de escleródios e massa de matéria fresca e seca. Testou-se também a inoculação de *S. sclerotiorum* com flores infestadas em folhas destacadas. Para a avaliação da eficiência de diversas espécies de crotalária no controle de nematoide *Meloidogyne javanica* foram instalados três experimentos. Quanto aos resultados de área abaixo da curva de progresso de doença, os menores valores apresentados foram para *C. grahamiana* e *C. breviflora*. Os maiores valores correspondem a *C. ochroleuca* e *C. juncea*. Os menores valores de fitomassa foram de *C. paulina*, *C. ochroleuca* e *C. anagyroides* e mais altos de *C. grahamiana* e *C. breviflora*. Na metodologia de inoculação de folhas com flores colonizadas, há necessidade de 48 a 72 horas de incubação das flores, junto ao fungo, para eficiente inoculação das folhas. Todas as espécies de crotalária podem ser consideradas como suscetíveis a *S. sclerotiorum*, entretanto a *C. grahamiana* exibiu maior resistência que as demais. Na avaliação da eficiência de diversas espécies de crotalária no controle de nematoide, foi demonstrada baixa reprodução para *Meloidogyne javanica* em todas as espécies de crotalárias, apresentando FR menor que 1, e apenas a *C. ochroleuca* obteve valores superiores comparados com as demais espécies. Nas avaliações das raízes

observaram que todas as espécies de crotalária foram penetradas pelo nematoide. O número de J2 observados em *C. grahamiana* foram superiores que nas demais espécies, no entanto a espécie apresentou maior massa de raiz entre as crotalárias e também apresentou baixo número de fêmeas. Nas *Crotalaria incana* não foram observadas fêmeas no interior das raízes diferentemente da *C. ochroleuca* que apresentou o maior número de fêmeas entre as demais espécies. Apenas as *C. juncea*, *C. ochroleuca* e *C. pallida* tiveram índice de fêmeas acima de 10%. Conclui-se que todas as espécies de crotalária apresentaram resistência à *Meloidogyne javanica* mesmo que apresentassem resultados diferentes entre si.

**Palavras-chave:** *Crotalaria anagyroides*, *C. breviflora*, *C. grahamiana*, *C. incana*, *C. juncea*, *C. lanceolata*, *C. ochroleuca*, *C. pallida*, *C. paulina*, *C. spectabilis*, mofo branco e meloidoginoses.

## RATTLEBOX REACTION TO *Sclerotinia sclerotiorum* AND *Meloidogyne javanica*.

### ABSTRACT:

The use of plants such as crotalaria increases the addition of soil organic matter that can stimulate the development of an antagonistic microflora, which favors the biological control of nematodes, besides producing alkaloids that present high toxicity to these phytoparasites. However, the choice of the plant species to be used in crop rotation and of major importance, since can affect the suppression of a population of one pathogen, it can result in non-potential increase of inoculum of others. The present work has as objective evaluate reaction to *Sclerotinia sclerotiorum* and efficiency in the control of nematodes of the galls under controlled conditions in Dourados, Mato Grosso do Sul, for which several experiments were installed. For evaluation of the reaction of different species of *Crotalaria* to *Sclerotinia sclerotiorum*. Different species were inoculated with *S. sclerotiorum* by the (toothpick colonised by pathogen mycelium) method. The incidence of symptomatic plants, severity, area under the disease progression curve (AUDPC), mass of sclerodes and mass of fresh and dry matter. An inoculation of *S. sclerotiorum* with infested flowers on detached leaves was also tested. For evaluation of the efficiency of the various species of crotalaria without control of nematodes *Meloidogyne javanica* were installed three experiments. Regarding the results of the area below the disease progress curve, the lowest values were for *C. grahamiana* and *C. breviflora*. The values highest correspond to *C. ochroleuca* and *C. juncea*. The values lowest phytomass were of *C. paulina*, *C. ochroleuca* and *C. anagyroides* and higher of *C. grahamiana* and *C. breviflora*. In the methodology of inoculation of leaves with colonized flowers, there were 48 hours of 72 hours of incubation of the flowers, together with the fungus, for efficient inoculation of the leaves. All species of rattlebox can be considered as susceptible to *S. sclerotiorum*, however *C. grahamiana* exhibited greater resistance than others. In evaluating the efficiency of all species of rattlebox without control of nematodes, it was demonstrated that it was reproduced for *M. javanica* in all rattlebox species, presenting RF less than 1, and only *C. ochroleuca* obtained higher values compared to the other species. In the



evaluations of the roots observed that all species of crotalaria were penetrated by the nematode. The number of J2 observed in *C. grahamiana*, were higher than the other species; however, one species had a higher root mass among crotalaria and also had a low number of females. *Crotalaria incana* no females were observed inside the roots differently from *C. ochroleuca* that presented the largest number of females among the rattlebox. Just as *C. juncea*, *C. ochroleuca* and *C. pallida* had an index of females above 10%. It was concluded that all species of rattlebox showed resistance to *Meloidogyne javanica* even though they presented different results among themselves.

**Keywords:** *Crotalaria anagyroides*, *C. breviflora*, *C. grahamiana*, *C. incana*, *C. juncea*, *C. lanceolata*, *C. ochroleuca*, *C. pallida*, *C. paulina*, *C. spectabilis*, white mold and root-knot nematode.

## INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é a mais importante oleaginosa cultivada no mundo. A partir da década de 60 no Brasil, ela se destacou como um dos principais contribuintes para a consolidação e a manutenção do país, como agroexportador no cenário internacional. Na safra 2015/2016, a cultura da soja representou 59,6% da área plantada, totalizando cerca de 33,3 milhões de hectares, com produção de 95,4 milhões de toneladas (CONAB, 2016). Os Estados Unidos da América, o Brasil e a Argentina, são os maiores produtores de soja do mundo. A soma da produção destes países representou cerca de 81,6% da produção mundial, na safra 2015/2016 (USDA, 2016)

Para a safra 2016/2017, estima-se que o Brasil terá produtividade média de 3.045,00 kg.ha<sup>-1</sup>(CONAB, 2016). Entretanto, vários fatores podem limitar esta produtividade, entre eles estão as doenças. Na cultura da soja no Brasil, já foi constatado um grande número de doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus (ITO, 2013; HARTMAN et al., 2015).

O controle de doenças de plantas pode ser realizado através da adoção de resistência genética, controle químico, controle biológico e também rotação de culturas com espécies não hospedeiras e/ou antagonistas. Em alguns casos, o uso de espécies de plantas não hospedeiras podem reduzir significativamente as infestações de patógenos. Um exemplo comum é o uso de espécies de crotalária para o controle dos nematoides das galhas da soja, causado por *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*. O nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) penetra nas raízes de *Crotalaria spectabilis*, mas não sobrevive, perecendo prematuramente. As crotalárias têm um crescimento vigoroso, proporcionando boa cobertura no solo, fixando nitrogênio através da simbiose com as bactérias, estimulando também o desenvolvimento de uma microflora antagonista que pode propiciar o controle biológico dos nematoides, a exemplo *C. juncea* fixam em média, entre 60 e 120 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> de N, apresentando relação C/N ao redor de 18 (BARRON, 1982; LORDELLO, 1982; KLOEPPER et al., 1991; WUTKE. et al., 2014).

*Crotalaria* L. pertence à tribo Crotalarieae (Benth.) Hutch., sendo o único gênero da tribo com representantes nativos no Brasil. O gênero é um dos maiores da família da Fabaceae, com 600 espécies nos trópicos e subtropicais do mundo. As espécies mais comuns no Brasil são *C. breviflora*, *C. juncea*, *C. ochroleuca*, *C. spectabilis*, entre outras Crotalárias são plantas herbáceas com cerca de 50 cm de altura

ou arbustos com até 3 m altura, possuem folhas digitadas trifolioladas, unifolioladas ou simples; flores predominantemente amarelas, com menos ou mais estrias ou manchas avermelhadas, dependendo da espécie; androceu formando um tubo monadelfo aberto na base com anteras dimorfas e vagem infladas, com as sementes soltas no seu interior (GARCIA et al., 2013; DEVECCHI et al., 2014) (ANEXO I).

Plantas da família das Fabáceas são as mais utilizadas como adubo verde. O uso de adubação verde na agricultura é uma prática de manejo que pode proporcionar aumento do teor de matéria orgânica do solo aumentando sua capacidade de troca de cátions e disponibilização de macro e micronutrientes. Adubação verde também pode proporcionar melhorias na parte física do solo, como a formação e estabilização de agregados, melhor infiltração de água e aeração além da redução da amplitude de variação térmica; controle dos nematoides e incorporação do nitrogênio ao solo pela fixação biológica (AMBROSANO et al., 2000). Algumas espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio como as dos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus*, dentre outras, podem apresentar grande potencial em produzir substâncias capazes de promover o crescimento vegetal, como hormônios, sideróforos, antibióticos, capacidade de solubilização de fosfatos e, em alguns casos, biocontrole de alguns patógenos associados às raízes como o nematoide *Meloidogyne graminicola* (SOUZA JUNIOR et al., 2010; BENEDUZI et al., 2012). O principal uso da crotalária é na adubação verde e cobertura, por serem plantas pouco exigentes em nutrientes do solo e com grande potencial de fixação biológica de nitrogênio. A produção de massa vegetal do adubo verde é um aspecto de grande importância. Padovan et al. (2014) observaram uma produção de 12,89 t ha<sup>-1</sup> de massa seca de *C. juncea*, 120 dias após a semeadura e acúmulo de N e K que corresponde em torno de 67 e 66 kg ha<sup>-1</sup> de ureia e cloreto de potássio, respectivamente.

Muitos produtores fazem rotação com Fabáceas, visando tanto ciclagem de nutrientes do solo como também o controle de pragas e doenças. *Crotalaria spectabilis* apresenta uma relação C/N entre 17 e 19 e no processo de simbiose pode fixar em média 150 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> de N. Vários trabalhos demonstram o controle aos nematoides formadores de galhas (*Meloidogyne* sp.), *Rotylenchulus reniformis* e de cistos (*Heterodera glycini*); apresenta também antagonismo a plantas infestantes como a tiririca (*Cyperus rotundus*) (WANG et al., 2001; SCHWAN, 2003; FONTANÉTTI et al., 2004; DANAHAAP e WONANG, 2016).

Como qualquer espécie vegetal, as crotalárias são atacadas por patógenos. Assim é importante conhecer as doenças que podem estar associadas às espécies a serem utilizados no sistema de rotação de culturas. A principal doença das espécies de crotalárias é a murcha causada pelo fungo de solo *Ceratocystis fimbriata*. Este patógeno é um limitante na produção de sementes de *C. juncea* e *C. spectabilis*, restringe o uso destas espécies em consórcios com mangueiras (*Mangifera indica* L.). Outras doenças importantes para a crotalária são as fusarioses, causada pelo *Fusarium udum* var. *crotalariae* e a antracnose causada por *Collectotrichum curvatum* (WANG et al., 2002). A maioria das espécies de crotalárias é suscetível a este patógeno. *Crotalaria juncea* e *C. lanceolata* são altamente suscetíveis a *Erysiphe cichoraceum*, causadora do oídio. *Crotalaria spectabilis* é suscetível a *Septoria crotalariae* (WUTKE, et al., 2014).

As maiores, das espécies de crotalárias são resistentes a *Phakopsora pachyrhizi*, um dos principais patógenos na agricultura brasileira, que é o causador da ferrugem asiática da soja, no entanto a *C. anagyroides* apresenta alta susceptibilidade a esse patógeno (RUPE e SCONYERS, 2008; PEREIRA e GAVASSONI, 2015). O mofo branco é outra doença que pode ocorrer tanto na cultura da soja, quanto em crotalárias. Oliveira et al., (2015) registrou a primeira ocorrência desta doença em *C. spectabilis* no sul do estado do Paraná. Esta doença é causada por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *S. sclerotiorum* é um importante patógeno e apresenta ocorrência cosmopolita (LEITE, 2005).

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary é um fungo pertencente à família Sclerotiniaceae, da ordem Helotiales e filo Ascomycota. Apresenta hifas hialinas, septadas, ramificadas e multinucleadas, com micélio variando de branco a castanho-amarelado. Os ascos são de cor marrom em apotécios emitidos de escleródios (BOLTON et al., 2006). Este patógeno é considerado o mais importante no mundo e está distribuído em todas as regiões produtoras, sejam temperadas, subtropicais ou tropicais. Ataca 408 espécies de plantas, distribuídas em 75 famílias 278 gêneros sendo a maioria de plantas dicotiledôneas, de grande importância econômica (BOLAND e HALL, 1994).

A ocorrência desse patógeno acarreta danos expressivos na produção e na qualidade, causando perdas de até 80% na cultura da soja. A fase mais vulnerável da cultura a este patógeno está da floração plena ao início da formação de vagens e enchimento dos grãos. Neste período, o dossel da planta cobre as entre linhas de plantio, propiciando condições favoráveis de umidade e temperatura para que os escleródios,

presentes no solo, germinem e produzem seus ascósporos. Em condições ideais, de alta umidade, o fungo pode colonizar tecidos saudáveis entre 16 e 24 horas após a infecção do tecido floral senescente. Em condições desfavoráveis, principalmente em tempo seco, o progresso da doença pode ser retardado, o micélio pode permanecer viável por até 144 horas, podendo retomar o crescimento em condições ideais (HARIKRISHNAN e DEL RÍO, 2006).

O fungo pode sobreviver no solo como escleródios. Os escleródios são as estruturas de resistência do fungo, podendo ficar no solo por vários anos até terem as condições ótimas para germinar. Os escleródios, agregados de hifas hialinas, apresentam um revestimento de melanina, que tem a função de protegê-los de condições adversas e de fungos parasitas (BOLTON et al., 2006). Os escleródios podem germinar de duas formas uma delas é a germinação carpogênica, onde ocorre a formação de apotécios, dando origem a ascósporos, que ao madurar serão ejetados dos ascos. Os ascósporos infectam a planta acima da superfície do solo. Outra forma de germinação é miceliogênica, pela emissão de hifas, que atacam os tecidos das plantas (LE TOURNEAU, 1979; PURDY, 1979). Vários fatores afetam a germinação dos escleródios: nutrientes do substrato, no qual o escleródio é formado; idade do escleródio, fatores ambientais como temperatura, luz, pH do solo e tipo do solo (WILLETTS e WONG; 1980).

A disseminação de *Sclerotinia sclerotiorum* a curtas distâncias pode ocorrer pelo vento, carregando ascósporos ou até escleródios mais leves presentes na superfície do solo, por máquinas agrícolas, pela água da irrigação ou de chuvas, ou por lote de sementes quando escleródios são transportados ou misturados aos grãos (ALMEIDA et al., 1997; DANIELSON et al., 2004).

O fungo é capaz de infectar qualquer parte da planta, porém a infecção inicia-se mais frequentemente a partir das inflorescências, das axilas das folhas e dos ramos laterais. O processo de desenvolvimento da doença inicia-se pela penetração mecânica da cutícula do hospedeiro ou pelos estômatos. Em seguida, ocorre a colonização de hifas entre a cutícula e a epiderme, e proliferação de hifas intra e intercelulares, emergência de hifas através dos estômatos do hospedeiro ou rompendo a cutícula, com a formação de micélio branco e escleródios na superfície do hospedeiro (LUMSDEN, 1979). Os sintomas iniciais são lesões encharcadas, que evoluem para marrom e rapidamente são cobertas por micélio branco de aspecto cotonoso. O micélio

branco dará origem aos escleródios. A parte aérea das plantas infectadas sofre murcha e morte das folhas (LUMSDENR, 1979).

Os apotécios são corpos de frutificações, representam a maior fonte de inóculo, pois produzem uma grande quantidade de ascósporos. Para que ocorra a germinação carpogênica, temperatura deve estar entre 10-20°C e deve haver luz suficiente, caso contrário, só ocorre a germinação miceliogênica, onde a produção de micélio tem um potencial epidêmico muito mais reduzido (WILLETTS e WONG, 1980).

Várias medidas culturais de controle podem ser utilizadas no manejo desta doença, como destruir os restos culturais, adotar aração profunda, evitar excesso de umidade; efetuar plantio com menor densidade; utilizar variedades de porte ereto, evitando a formação de microclima favorável; adotar a rotação de cultura, sendo a rotação fundamental para o manejo da doença da *S. sclerotiorum* (ILLIPRONTI e MACHADO, 1993).

A rotação de culturas é uma prática que apresenta grande potencial no manejo das doenças de plantas. O uso de plantas como cobertura é uma alternativa para aumentar a sustentabilidade dos sistemas agrícolas. Estas plantas possuem capacidade de absorver nutrientes das camadas subsuperficiais do solo e liberá-los pela decomposição dos seus resíduos (BERNARDES et al., 2010). Culturas de cobertura geram uma grande quantidade de matéria seca. Entretanto, a escolha da espécie de planta a ser utilizada na rotação de culturas é de suma importância, pois da mesma forma que pode afetar supressivamente a população do patógeno alvo, pode resultar em aumento no potencial de inóculo de outros patógenos.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a reação de diferentes espécies de crotalárias à *Sclerotinia sclerotiorum* e a eficiência no controle de nematoide das galhas. Para isso este trabalho está dividido em dois capítulos: O primeiro, com o objetivo de avaliar a reação de espécies de crotalária à *Sclerotinia sclerotiorum*, além de testar um método de inoculação em folhas destacadas. O segundo capítulo avaliou a eficiência no controle de nematoide *Meloidogyne javanica* pelas diferentes espécies usadas no primeiro capítulo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. F. V.; HENNING, A. A. Doenças da soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia**. v. 2. Doenças das plantas cultivadas. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. Cap. 61, p. 642-664.
- AMBROSANO, E. J.; MURAOKA, T.; AMBROSANO, G. M. B.; TRIVELIN, P. C.; WUTKE, E. B.; TAMISO, L. G. O papel das leguminosas para adubação verde em sistemas orgânicos. **In: Curso regional de agricultura orgânica/adubação verde para agricultura orgânica**. Piracicaba, p. 17-76, 2000.
- AVENDAÑO, N. Revisión taxonómica del género *Crotalaria* L. (faboideae-crotalarieae) en Venezuela. **Acta Botánica Venezuelica**, Caracas, v. 34, n. 1, p. 13-78, 2011.
- BARRON, G. L. in. BURNS R. G; SLATER, J. H. eds. Experimental Microbiological Ecology **Nematode-destroying fungi**.. Blackwell Scientific Publications, 1982. p. 533-551.
- BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 4, p. 1044-1051, 2012.
- BERNARDES, T. G.; SILVEIRA, P. M.; MESQUITA, M. A. M.; AGUIAR, R. A.; MESQUITA, G. M. Decomposição da biomassa e liberação de nutrientes dos capins braquiária e mombaça, em condições de cerrado. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 40, n. 3, p. 370-377, 2010. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/pat/article/view/5584>>. Acesso em: 2 fev. 2017.
- BOLAND, G.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, n. 2, p. 93–108, 1994.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento da Safra Brasileira Grãos, Safra 2016/17**. Terceiro Levantamento, Brasília, v. 4, n. 3, p. 1-156, 2016. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_12\\_22\\_12\\_08\\_27\\_boletim\\_graos\\_dezembro\\_2016.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_12_22_12_08_27_boletim_graos_dezembro_2016.pdf)>. Acesso em: 2 fev. 2017.
- DANAHAP, L. S.; WONANG, D. L. Antinematicidal Efficacy Of Root Exudates Of Some *Crotalaria* Species On *Meloidogyne Incognita* (Root-Knot Nematode) (Kofoid And White) Chitwood Isolated From Infected *Lycopersicum esculentum* L.(Tomato) **Plant. International Journal Of Scientific & Technology Research**. v. 5, n. 03, p. 79-84, 2016.
- DANIELSON, G. A.; NELSON, B. D.; HELMS, T. C. Effect of *Sclerotinia stem rot* on yield of soybean inoculated at different growth stages. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, n. 3, p. 297-300, 2004.

- DEVECCHI, M. F.; PIRANI, J. R.; MELO-DE-PINNA, G. F. A. Comparative leaf anatomy and morphology of some Brazilian species of *Crotalaria* L. (Leguminosae: Papilionoideae: Crotalarieae). **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 28, n. 4, p. 583-593, 2014.
- FONTANÉTTI, A.; CARVALHO, G. J.; MORAIS, A. R.; ALMEIDA, K.; DUARTE, W. F. Adubação verde no controle de plantas invasoras nas culturas de alface-americana e de repolho. **Ciências Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 967-973, 2004.
- GARCIA, J. M.; KAWAKITA, K.; MIOTTO, S. T. S.; SOUZA, M. C. de. O gênero *Crotalaria* L. (Leguminosae, Faboideae, Crotalarieae) na Planície de Inundação do Alto Rio Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 209-226, 2013.
- HARIKRISHNAN, R.; Del RÍO, L. E. Influence of temperature, relative humidity, ascospore concentration, and length of drying of colonized dry bean flowers on white mold development. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, n. 7, p. 946-950, 2006.
- HARTMAN, G. L.; RUPE, J. C.; SIKORA, E. J.; Domier, L. L.; Jeff A Davis; Kevin Lloyd Steffey. **Compendium of soybean diseases and pests**. St. Paul, Minnesota, U.S.A.: APS Press, The American Phytopathological Society, 2015. 201 p.
- ILLIPRONTI, E.; MACHADO JR., R. A.; MACHADO, J. C. Antagonismo de fungos a *Sclerotinia sclerotiorum* em soja e feijão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 162-166, 1993.
- ITO, M. F. **Principais doenças da cultura da soja e manejo integrado**. 1º Encontro técnico sobre as culturas da soja e do milho no noroeste paulista. v. 10, n. 3, p. 83-102, 2013. DOI: 10.3738/nucleus.v0i0.908
- KLOEPPER, J. W.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; McINROY, J. A.; COLLINS, D. J. Analysis of populations and physiological characterization of microorganisms in rhizospheres of plants with antagonistic properties to phytopathogenic nematodes. **Plant and Soil**, Haia, v. 136, n. 1, p. 95-102, 1991.
- LE TOURNEAU, D. Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 887-890, 1979.
- LEITE, R. M. V. B. C. **Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. (Comunicado Técnico, 76).
- LORDELLO, L. G. E. **Nematoides das plantas cultivadas**. 7. ed. São Paulo: Nobel, 1982. 146-147p.
- LUMSDENR, D. Histology and physiology of pathogenesis in plant diseases caused by *Sclerotinia species*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 890-896, 1979.
- PADOVAN, M. P.; CARNEIRO, L. F.; MOITINHO, M. R.; FELISBERTO, G.; CARNEIRO, D. N. M.; MOTTA, I. de S. Dinâmica de Acúmulo de Massa e Nutrientes pela *Crotalaria juncea* para fins de adubação verde e o estágio adequado para seu manejo. In: AGROECOL, 9., 2014. Dourados. **Cadernos de Agroecologia...** Dourados.



PEREIRA, N. G. M.; GAVASSONI, W. L. Suscetibilidade de soja a *Phakopsora* sp. atacando *Crotalaria anagyroides*. **II Encontro de Ensino, Pesquisa e Extensão. Dourados**. 2015. Disponível em: <eventos.ufgd.edu.br/enepex/anais/arquivos/1177.pdf>. Acessado em: 17 jan. 2017.

PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. **Phytopatology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 875-880, 1979.

RUPE, J.; SCONYERS, L. Soybean Rust. **The Plant Health Instructor**. American Phytopathological Society. DOI:10.1094/PHI-I-2008-0401-01 2008.

SCHWAN, A. V. **Antagonismo de espécies de Crotalaria ao nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe)**. 2003. 59 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal Mato Grosso do Sul, Dourados-MS.

SOUZA JUNIOR, I. T. de; MOURA, A. B.; SCHAFFER, J. T.; CORRÊA, B. O.; GOMES, C. B. Biocontrole da queima-das-bainhas e do nematoide-das-galhas e promoção de crescimento de plantas de arroz por rizobactérias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 11, p. 1259-1267, 2010.

OLIVEIRA, R. R.; BRAZ, G. B. P.; OLIVEIRA JR., R. S.; HENTGES, M.; TAKANO, H. K.; VIDA, J. B. First Report of Sclerotinia Blight Caused by *Sclerotinia sclerotiorum* on *Crotalaria spectabilis* in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 99, n. 7, p. 1037. 2015.

USDA (United States Department of Agriculture). **Crop Production 2011 Summary**. January 2016. Disponível em: <<https://www.ers.usda.gov/webdocs/publications/ocs16l/ocs-16l.pdf?v=42716>>. Acesso em: 15 dec. 2016.

WANG, K. H.; SIPES, B. S.; SCHMITT, D. P. Suppression of *Rotylenchulus reniformis* by *Crotalaria juncea*, *Brassica napus*, and *Tagetes erecta*. **Nematropica**, Lakeland. v. 31, n. 2, p. 235-250, 2001.

WANG, K.-H.; SIPES, B. S.; SCHMITT, D. P. Crotalaria as a cover crop for nematode management: a review. **Nematropica**, Lakeland, v. 32, n. 1, p. 35-57, 2002.

WILLETS, H. J.; WONG, J. A. L. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. **Botanical Review**, Cambridge, v. 46, p. 10-165, 1980.

WUTKE, E. B.; AMBROSANO, E. J.; BRAGA, N. R.; ESTEVES, J. A. F.; GALLO, P. B.; MARTINS, A. L. M.; BOLONHEZI, D.; TIVELLI, S. W. Crotalária. In: AGUIAR, A.T.E.; GONÇALVES, C.; PATERNIANI, M.E.A.G.Z.; TUCCI, M.L.S; CASTRO, C.E.F. (Eds.). Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas. 7.a Ed. rev. e atual. Campinas: Instituto Agrônômico. (**Boletim IAC, nº 200**). p. 162- 165. 2014.

## CAPÍTULO I

### REAÇÃO DE CROTALÁRIA À *Sclerotinia sclerotiorum*

#### RESUMO

As crotalárias são plantas utilizadas em rotação de culturas por apresentarem benefícios tais como a disponibilização de nitrogênio através simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênios, alta produção de massa vegetal, reciclagem de nutrientes e controle de nematoides. A escolha da espécie vegetal em um programa de rotação de cultura deve considerar a suscetibilidade a outros patógenos presentes na área. Com o objetivo de avaliar a reação de diferentes espécies de Crotalária à *Sclerotinia sclerotiorum*, cinquenta dias após a semeadura em vasos as plantas de diferentes espécies foram inoculadas com *S. sclerotiorum* pelo método do palito com micélio. Avaliou-se incidência das plantas sintomáticas, severidade, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), massa de escleródios e massa de matéria fresca e seca. Testou-se também a inoculação de *S. sclerotiorum* com flores infestadas em folhas destacadas. Para incidência, todas as plantas das espécies não obtiveram diferenças significativas, entretanto os resultados de índice de doença da *C. grahamiana* foram menores que os demais. Quanto aos resultados de área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD), os menores valores apresentados foram para *C. grahamiana* e *C. brevisflora*. Os maiores valores correspondem a *C. ochroleuca* e *C. juncea*. Os menores valores de fitomassa foram de *C. paulina*, *C. ochroleuca* e *C. anagyroides* e mais altos de *C. grahamiana* e *C. brevisflora*. Na metodologia de inoculação de folhas com flores colonizadas, há necessidade de 48 a 72 horas de incubação das flores, junto ao fungo, para eficiente inoculação das folhas. Todas as espécies de crotalárias podem ser consideradas suscetíveis a *S. sclerotiorum*, entretanto a *C. grahamiana* exibe maior tolerância que as demais espécies. Na metodologia de inoculação de folhas com flores colonizadas, há necessidade de 48 a 72 horas de incubação das flores, junto ao fungo, para eficiente inoculação das folhas.

**Palavra-chave:** *Crotalaria anagyroides*, *C. brevisflora*, *C. grahamiana*, *C. incana*, *C. juncea*, *C. lanceolata*, *C. ochroleuca*, *C. pallida*, *C. paulina*, *C. spectabilis* e Mofo Branco

## RATTLEBOX REACTION TO *Sclerotinia sclerotiorum*

### ABSTRACT:

Rattlebox are plants used in crop rotation, because they present benefits such as: availability of nitrogen through symbiosis with nitrogen-fixing bacteria, high production of plant mass, nutrient recycling and control of nematodes. The choice of the plant species in a crop rotation program should consider the susceptibility to other pathogens present in the area. The objective of this experiment was to evaluate the reaction of different species of *Crotalaria* to *Sclerotinia sclerotiorum*. Fifty days after sowing in pots, the plants of different species were inoculated with *S. sclerotiorum* by (toothpick colonised by pathogen mycelium) method. The incidence of symptomatic plants, severity, area under the disease progress curve (AUDPC), mass of sclerodes and mass of fresh and dry matter were evaluated. The inoculation of *S. sclerotiorum* with flowers infested with prominent leaves was also tested. For incidence, all the plants of the species did not obtain significant differences, however the results of disease index of *C. grahamiana* were smaller than the others. Regarding the area results below the disease progress curve (AUDPC), the lowest values presented were for *C. grahamiana* and *C. breviflora*. The highest values correspond to *C. ochroleuca* and *C. juncea*. The lowest phytomass values were of *C. paulina*, *C. ochroleuca* and *C. anagyroides* and higher of *C. grahamiana* and *C. breviflora*. In the methodology of inoculation of leaves with colonized flowers, it is necessary 48 to 72 hours of incubation of the flowers, together with the fungus, for efficient inoculation of the leaves. All species of *crotalaria* can be considered susceptible to *S. sclerotiorum*, however, *C. grahamiana* exhibits greater tolerance than the other species. In the methodology of inoculation of leaves with colonized flowers, there is a need for 48 to 72 hours of incubation of the flowers, together with the fungus, for efficient inoculation of the leaves.

**Keywords:** *Crotalaria anagyroides*, *C. breviflora*, *C. grahamiana*, *C. incana*, *C. juncea*, *C. lanceolata*, *C. ochroleuca*, *C. pallida*, *C. paulina*, *C. spectabilis* and White Mold

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo e sua economia é diretamente afetada pela agricultura (SILVA et al., 2015). A estimativa para a safra, 2016/2017 é que alcance 102,5 milhões de toneladas com produtividade média, de 3.045,00kg.ha<sup>-1</sup>(CONAB, 2016). No entanto, um fator que poderá limitar estes altos rendimentos são as doenças. Aproximadamente 40 doenças causadas por nematoides, fungos, bactérias e vírus já foram identificadas no Brasil. As perdas anuais de produção por pragas e doenças são estimadas em cerca de 20% a 40% global (SAVARY et al., 2012).

Dentre as principais doenças da soja, o mofo-branco apresenta grande importância em função de sua severidade e perdas provocadas, principalmente em regiões de temperaturas amenas, Esta doença é causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Este patógeno é extremamente polífago, pode atacar mais de 500 espécies de plantas, em todo mundo, incluindo cereais, frutíferas, plantas ornamentais, árvores, arbustos e diversas plantas daninhas. Este patógeno é considerado o mais importante no mundo e está distribuído em todas as regiões produtoras, sejam temperadas, subtropicais ou tropicais (SAHARAN e MEHTA, 2008).

No Brasil, teve seu primeiro relato no estado de São Paulo em 1921 na cultura da batata (*Solanum tuberosum L.*), nos anos seguintes, a doença e o patógeno foram verificados sobre diferentes hospedeiros em outros estados do país (CHAVES, 1964). Na cultura da soja, a doença foi constatada pela primeira vez em 1975, no sul do estado do Paraná, causando perdas de até 70%, de plantas infectadas em lavouras destinadas a produção de sementes, estima-se a presença do fungo em mais de seis milhões de hectares de soja no Brasil (JULIATTI et al., 2015).

Este patógeno pode sobreviver no solo através de estruturas de resistência conhecidas como escleródio. O escleródio é formado por uma massa formada a partir do enovelamento de hifas recoberta por uma camada de melanina (TOWNSEND e WILLETTS, 1954; BOLTON et al., 2006).

Os escleródios podem sobreviver no solo por vários anos, e para que a germinação carpogênica ocorra, os escleródios devem receber luz suficiente e temperaturas ótimas entre 15 e 20°C (CLARKSON et al., 2004). Os apotécios, resultado da germinação carpogênica de escleródios, são a maior fonte de inóculo do fungo, pois produzem uma grande quantidade de ascósporos que ejetados, são facilmente

transportados pelo vento e podem infectar plantas em um raio de 50 a 100m da fonte produtora. (AWABI e GROGAN, 1975). Outra forma de germinação é miceliogênica, pela emissão de hifas, que atacam os tecidos das plantas (LE TOURNEAU, 1979; PURDY, 1979). Além da temperatura e a luz, vários fatores podem afetar a germinação dos escleródios tais como: nutrientes do substrato, no qual o escleródio é formado; idade do escleródio, fatores ambientais como pH do solo e tipo do solo (WILLETTS e WONG; 1980).

O controle de mofo branco envolve uma série de medidas integradas, tais como: evitar a introdução do fungo na área utilizando semente certificada livre do patógeno; efetuar tratamento de semente com mistura de fungicidas de contato e benzimidazóis, recomenda-se o uso do controle genético com cultivares resistente, controle cultural e controle biológico.

O controle de doenças por meio da resistência genética é a forma mais econômica, no entanto o número de cultivares resistente é limitado. O controle genético da resistência ao mofo branco é bastante complexo, com a participação de resistência fisiológica e de um hábito de crescimento mais compacto que pode ser caracterizado pelos mecanismos de escape da planta a doença (MIKLAS et al., 2013). Em feijoeiro, caracteres morfológicos como a arquitetura da planta, maturidade precoce e conteúdo de lignina funcionam como mecanismos de escape para controlar a doença. Tais caracteres afetam condições microclimáticas, como umidade, luminosidade e aeração, que influenciam o estabelecimento e desenvolvimento do patógeno (KOLKMAN e KELLY, 2002).

Não é totalmente clara, qual parte da resistência ao mofo branco resulta da resistência fisiológica e qual parte resulta dos mecanismos de escape. O escape corresponde às características das plantas que desfavorecem o desenvolvimento da doença, gerando um microclima não benéfico, e a resistência fisiológica é a tolerância a oxalato, produzido pelo fungo, que inibe as enzimas responsáveis pelos mecanismos de defesas da planta e aumentando a atividade das enzimas do patógeno, responsáveis pela degradação da parede celular da planta (LUMSDENR, 1979).

Dentre as demais medidas de controle destaca-se, o controle cultural pela adoção do sistema de rotação de culturas com espécies não hospedeiras, como milho, sorgo, milheto, aveia branca ou trigo, reduz a incidência do mofo branco, afetando diretamente o ciclo de vida do patógeno e incrementa a atividade de microrganismos benéficos responsáveis por seu biocontrole. Em área de ocorrência do patógeno além da

rotação de cultura recomenda-se aumentar o espaçamento entre linhas de cultivo, reduzindo a população ao mínimo recomendado. Aplicações de fungicidas podem ser realizadas no início do florescimento e durante a floração (JULLIATI et al., 2015).

Muitos produtores fazem rotação com leguminosas visando tanto ciclagem de nutrientes do solo como também o controle de pragas e doenças. A rotação de culturas além de melhorarem as características físicas, químicas e biológicas do solo, com a recuperação da matéria orgânica, reciclagem de nutrientes, diminuição da erosão, favorece o incremento da atividade microbiana do solo, permitem o crescimento de inimigos naturais. Atualmente a *Crotalaria juncea*, *C. spectabilis* são uma das espécies mais utilizadas das fabáceas, principalmente por apresentarem alta produtividade de material vegetal, proporcionando boa cobertura no solo, fixando nitrogênio através da simbiose com as bactérias e não serem hospedeira de determinados patógenos.

No entanto, como qualquer espécie vegetal, as crotalárias são passíveis de serem acometidas por doenças sendo assim é muito importante conhecer os patógenos, que podem atacar as espécies a serem utilizadas no sistema de rotação de culturas. Assim, desenvolveu-se um estudo com o objetivo de avaliar a reação de espécies de crotalárias a *Sclerotinia sclerotiorum*.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia (LMAF) e casa de vegetação da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Grandes Dourados, no período de outubro de 2013 à janeiro de 2017.

Foram conduzidos quatro experimentos: três para avaliar a reação de espécies de crotalária a *Sclerotinia sclerotiorum* e um para testar a metodologia de inoculação de folhas destacadas com flores, colonizadas pelo patógeno.

### **Multiplicação das espécies de crotalária**

Inicialmente foram utilizadas oito espécies de crotalária (*Crotalaria anagyroides*, *C. breviflora*, *C. grahamiana*, *C. incana*, *C. juncea*, *C. ochroleuca*, *C. paulina* e *C. spectabilis*). As espécies foram obtidas de empresas produtoras de sementes e institutos de pesquisas, tais como: Sementes Pirai, Embrapa Agropecuária Oeste e Instituto Agrônomo de Campinas, além de coleta de sementes em pastagens no Município de Itaquiraí, das espécies *Crotalaria lanceolata* e *C. pallida*, comumente encontradas na região e identificadas com auxílio de chave de identificação para as espécies de *Crotalaria* ocorrentes no Brasil (GARCIA et al., 2013; DEVECCHI et al., 2014).

As sementes das crotalárias foram multiplicadas em casa de vegetação, em vasos de polietileno contendo 4,4 dm<sup>3</sup> de solo do tipo Latossolo Vermelho Distroférrico, corrigido e adubado, e após a emergência das plântulas foi realizado o desbaste deixando apenas duas plântulas por vaso. A irrigação foi realizada, mantendo-se um turno de rega diário, de modo a manter a umidade do solo em 60% da capacidade de campo. As espécies do gênero *Crotalaria* foram também cultivadas em canteiros na área experimental da FCA/UFGD para multiplicação de sementes.

### **Reação de espécies de crotalária a *Sclerotinia sclerotiorum***

Foram realizados três ensaios em casa-de-vegetação e em laboratório, entre o período de novembro de 2013 à janeiro de 2017. Utilizou-se o método do palito para inoculação dos fungos nos ensaios (GÁSPERI et al., 2003).

As mudas das espécies de crotalária, do primeiro ensaio, foram preparadas no dia 30/08/2013, em bandejas de poliestireno, e transplantadas no dia 11/09/2013,

deixando apenas duas plantas por vaso. No segundo ensaio, a semeadura foi realizada no dia 01/11/2013 e o transplante no dia 15/11/2013, e por fim, o terceiro ensaio a semeadura foi realizado no dia 06/09/2016 e transplantada no dia 4/10/2016.

Os vasos de polietileno continham 4,4 dm<sup>3</sup> de um substrato composto de solo do tipo Latossolo Vermelho Distroférico + areia + substrato PlantMax Hortaliças<sup>®</sup> (casca de pinus, turfa, calcário, superfosfato simples e nitrato de potássio) na proporção 1:1:1, corrigido com calcário dolomítico visando saturação de base de 60%. A irrigação na casa de vegetação era automática com um turno de rega diário.

No primeiro ensaio, utilizou-se o delineamento experimental de blocos casualizados com oito tratamentos (espécies de crotalárias) e sete repetições. Para cada parcela inoculada, foi instalada uma parcela controle, em que os palitos foram inseridos sem o patógeno. Cada vaso com duas plantas representou uma repetição.

No segundo ensaio, utilizou-se o delineamento experimental em blocos casualizados com oito tratamentos e quatro repetições e no terceiro ensaio utilizou-se o delineamento experimental de blocos casualizados com dez tratamentos e oito repetições, neste caso a parcela experimental foi representada por dois vasos com duas plantas cada.

O inóculo usado nos ensaios foi obtido da micoteca do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da UFGD, o qual foi isolado e obtido de plantas de soja no município de Naviraí, em 2005. Os escleródios usados foram desinfestados em solução de álcool à 70%, por 1 minuto, hipoclorito de sódio, à 2%, por 1 minuto, e lavadas por 1 minuto em água destilada e esterilizadas. Os escleródios foram transferidos para placas de petri contendo BDA. As placas permaneceram em câmara de incubação tipo BOD à 23 °C±2, em escuro contínuo. Após cinco dias, foi realizada a repicagem em disco de micélio 5mm de diâmetro para um nova placa com BDA 48 deixando horas nas mesmas condições descrita anteriormente.

Pontas de palitos de dente foram cortados a 15 mm da extremidade e esterilizadas a 120°C, durante 20 minutos. Logo após, foram colocados 20 palitos por placa de petri, contendo meio BDA, em posição vertical, com a ponta para cima em fileiras circulares. Ao centro da placa colocou-se um disco de micélio, após um período, aproximadamente, de 72 horas quando se observou que todas as pontas dos palitos se encontrassem com micélio, estas já estavam prontas para serem inoculadas nas plantas (GÁSPERI et al., 2003) (Figura 1).



Após o período de incubação, foram realizadas as inoculações nos diferentes ensaios, no dia 22/10/2013, para o primeiro ensaio; 14/12/2013, para o segundo e 9/12/2016, para o terceiro. As pontas dos palitos foram inseridas nas hastes das plantas no terço médio, colocadas em câmara úmida por um período de 12 horas, enquanto palitos apenas esterilizados foram inseridos nas plantas testemunhas.



FIGURA 1. Planta de *Crotalaria spectabilis* inoculada com *S. sclerotiorum* pelo método do palito. Dourados, MS, 2017.

Para avaliar a reação das diferentes espécies à *S. sclerotiorum* adaptou-se uma escala de notas baseada no método proposto por Venturoso (2012), onde nota 0 = ausência de sintomas; 1 = início do desenvolvimento de uma lesão circular; 2=lesão de até 1,0 cm de comprimento; 3 = lesão entre 1,1 e 2,0 cm; 4 = lesão entre 2,1 a 5,0 cm; 5 = lesão maior que 5,0 cm sem escleródio; 6 = lesão maior que 5,0 cm com escleródio; 7 = planta quebrada; 8 = planta morta (considerou-se como planta morta, as plantas que o patógeno colonizou todas as gemas lateais, impossibilitando seu desenvolvimento). As avaliações foram iniciadas 48 horas após a inoculação e realizadas a cada 48 horas, até a estabilização das notas. O número de plantas mortas foi registrada e calculada a incidência (%) da doença.

O cálculo da porcentagem de plantas mortas para o terceiro ensaio foi realizado diferentemente das anteriores, onde se considerou a evolução da lesão,

considerando que as plantas quebradas recebesse a nota de planta morta (REIMONTE e CASTAÑO, 2008).

Com os dados da severidade da doença, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) com a equação proposta por Shanner e Finney (1977).

$$\sum = \frac{Dt_2 + Dt_1}{2} * (t_2 - t_1)$$

Em que “t” representa o tempo entre avaliações consecutivas e Dt representa a nota no tempo “t”.

O índice de doença foi calculado por meio da equação:

ID=  $\sum$  (*grau da escala \* frequência*) \* 100/(*nº total de unidades \* grau máximo da escala*) de McKinney (1923).

Foram avaliadas massa de escleródios formados (g), para o primeiro e segundo ensaio. No terceiro ensaio avaliou-se, massa escleródio (g) e o número de escleródios. Calculou-se também a porcentagem de plantas com escleródios, massa por escleródios e número de escleródio por planta.

Apenas no primeiro ensaio foram avaliadas a massa verde e massa seca da parte aérea das plantas de crotalária.

Os dados de índice de doença de McKinney, área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), dados de escleródio e dados de fitomassa foram analisados com a aplicação do teste F, previamente transformados em  $\sqrt{x + 1}$ . Para todos os ensaios foram analisadas as variâncias com aplicação do teste de LSD Fisher a 5% probabilidade, para comparação entre as médias. Os dados de porcentagem de plantas mortas foram transformados em  $\text{arc sen } \sqrt{x/100}$ . Para as análises estatísticas, foi utilizado o programa SISVAR (FERREIRA, 2011). Foi realizada a análise de correlação linear entre todos os caracteres observados.

No terceiro ensaio, os dados de porcentagem de plantas mortas foram transformados em  $\text{arc sen } \sqrt{x}/100$ . Nesta variável foram utilizados os dados brutos de tamanho de lesão e plantas mortas. Foi feita a análise de variância, com aplicação do teste LSD Fisher, a 5% de probabilidade, usando o programa SAS 9.0 (STATISTICAL ANALYSES SYSTEM, 1985).

### Avaliação da metodologia de inoculação com flores colonizadas

O experimento para testar a reação de folhas destacadas de crotalárias a *S. sclerotiorum* com flores colonizadas com o fungo, foi realizado no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia, no período de 5 a 15 de dezembro 2013.

Os folíolos e as flores foram obtidos de plantas de *C. anagyroides* cultivadas a campo. Utilizou-se o delineamento experimental em blocos casualizados em esquema fatorial 6x2, com seis tempos de exposição à *S. sclerotiorum* e dois pontos de inoculação (face abaxial e face adaxial das folhas) e quatro repetições.

Durante quatro dias foram coletadas flores de *C. anagyroides* e expostas a quatro tempos diferentes a micélio do patógeno. As primeiras flores coletadas tiveram quatro dias de incubação (96h); as segundas, três dias (72h); as terceiras, dois dias (48h); e as últimas, só um dia de incubação com o patógeno (24h) (Figuras 2, 3). No quinto dia, foram coletados os folíolos para proceder a sua inoculação com as flores já colonizadas e também com disco de micélio retirado de colônias de quatro dias de idade. Os folíolos considerados testemunhas, não foram inoculados. O micélio do fungo utilizado foi obtido a partir de isolados de plantas de crotalária infectadas com *S. sclerotiorum*.

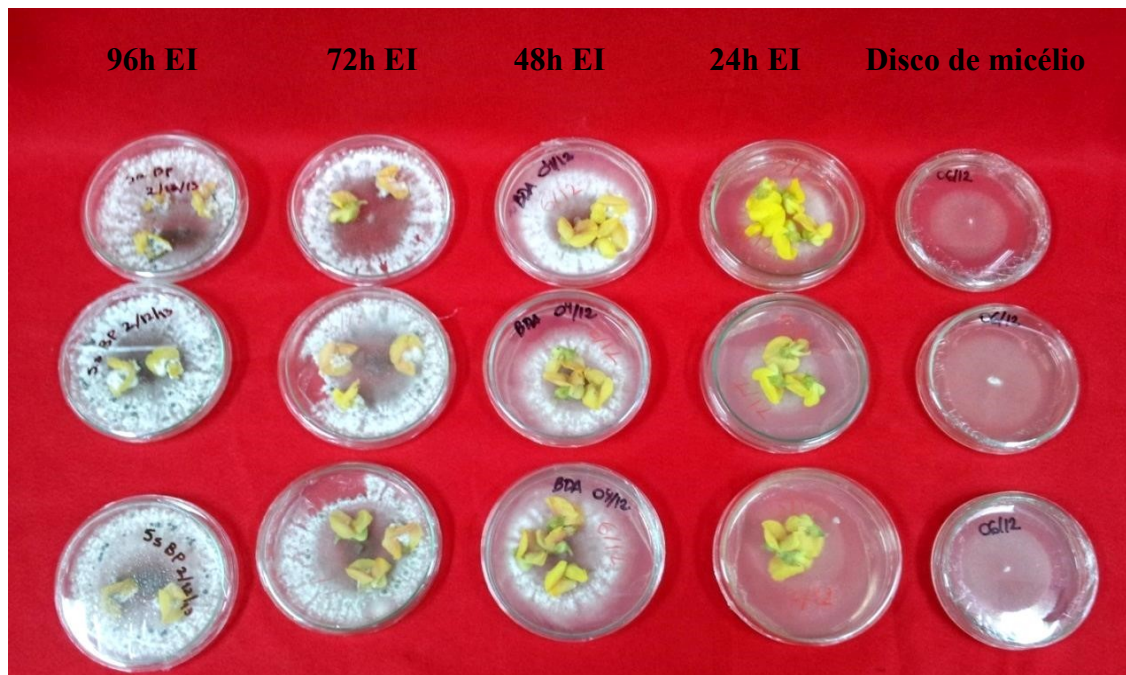


FIGURA 2. Flores de *C. anagyroides* com diferentes tempos de exposição ao inóculo (EI) e colônias *S. sclerotiorum* com quatro dias de incubação, de onde foram retirados os discos de micélio utilizados para a inoculação das folhas destacadas. Dourados, MS, 2017.

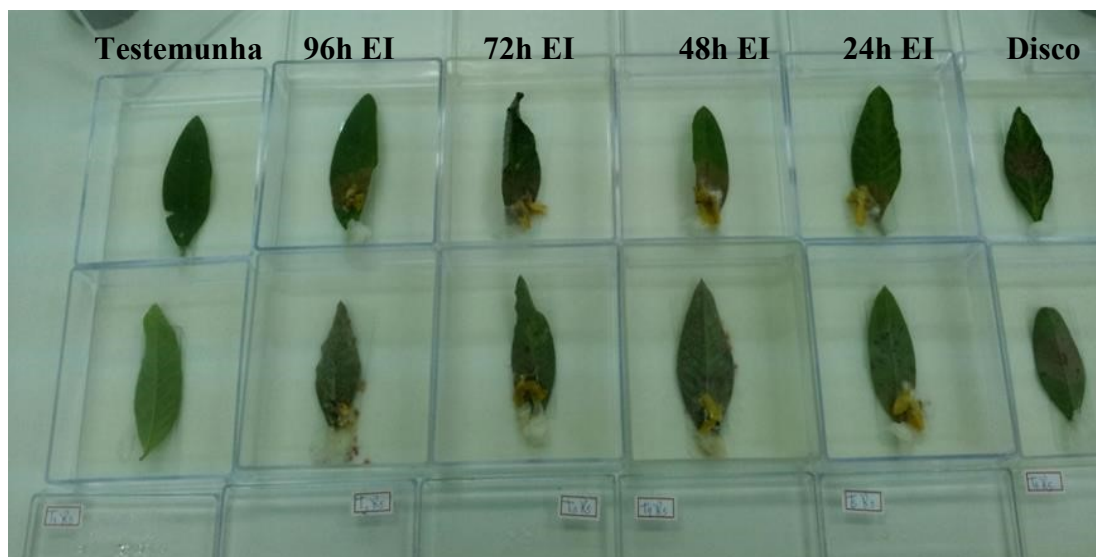


FIGURA 3. Folhas destacadas inoculadas com flores em diferentes tempos de exposição ao inóculo (EI), com disco de micélio e testemunha. Dourados, MS, 2017.

A inoculação foi feita em câmara de fluxo laminar, colocando as flores colonizadas na parte abaxial de quatro folíolos destacados, e na parte adaxial de outras 4 folíolos destacados, em gerbox. O mesmo foi feito com o disco de micélio. Os folíolos já inoculados e as oito testemunhas foram colocadas em câmara tipo BOD, em fotoperíodo de escuro contínuo.

As avaliações começaram 48h após a inoculação, utilizando-se uma escala com base na área necrosada, em decorrência da infecção por *S. sclerotiorum*, proposta por Garcia e Juliatti (2012) (Figura 4).

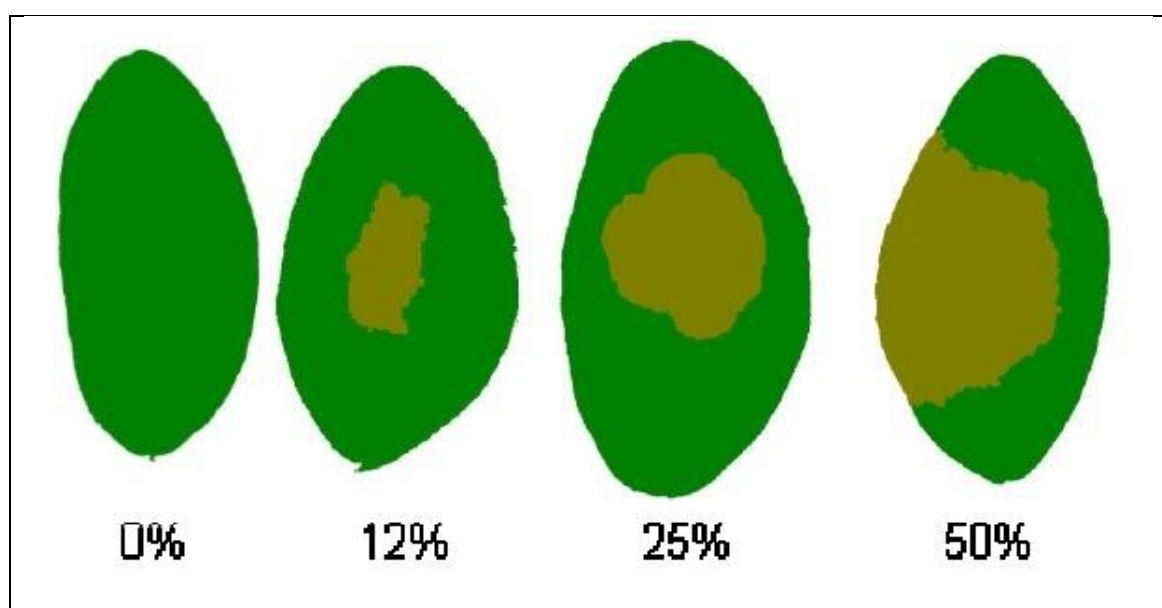


FIGURA 4 Escala diagramática para avaliação de sintomas de *Sclerotinia sclerotiorum* em folíolo de soja (GARCIA e JULIATTI, 2012).

Os dados de severidade da doença (área foliar doente), área AACPD e a massa de escleródios foram transformados em  $\sqrt{x+1}$  e submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de LSD Fisher, a 5% de probabilidade, com o auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Reação pelo método do palito

Todas as espécies inoculadas apresentaram sintomas decorrentes da colonização por *S. sclerotiorum*. O método de inoculação com palito mostrou ser eficiente para causar doença, e também evidenciou comportamentos diferentes entre as espécies de crotalária. *Crotalaria grahamiana* apresentou menor índice de doença que as demais espécies, com número reduzido de massa de escleródios. A incidência de plantas mortas também foi menor em *C. grahamiana* e *C. incana*. *C. ochroleuca* e *C. juncea* apresentou as maiores massas de escleródios (Quadro 1).

QUADRO 1. Incidência de plantas com lesão (%), índice de doença McKinney, área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD), massa de escleródios e plantas mortas (%) em espécies de Crotalária inoculadas com *S. sclerotiorum*, primeiro ensaio. Dourados, MS, 2017.

Espécies	Incidência de plantas com lesão (%)	Índice de doença McKinney	AACPD	Massa de escleródios (g)	Plantas Mortas (%)
<i>C. anagyroides</i>	100,0 b	83,9 b	2250,9 b	0,13 cd	78,6 de
<i>C. breviflora</i>	100,0 b	87,5 b	1932,1 a	0,03 a	28,6 bc
<i>C. grahamiana</i>	100,0 b	58,9 a	1700,0 a	0,07 ab	0,0 a
<i>C. incana</i>	100,0 b	87,5 b	2351,8 bc	0,16 d	7,1 ab
<i>C. juncea</i>	100,0 b	91,1 bc	2333,9 bc	0,23 e	50,0 cd
<i>C. ochroleuca</i>	100,0 b	100,0 c	2702,7 d	0,23 e	100,0 e
<i>C. paulina</i>	100,0 b	91,9 bc	2658,9 cd	0,12 cd	78,6 de
<i>C. spectabilis</i>	92,8 a	84,8 b	2321,4 b	0,09 bc	64,3 de
CV(%)	5,0	11,1	13,1	1,98	42,3

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste LSD Fisher a 5% de probabilidade.

Os dados de porcentagem foram transformados em  $\arcsen \sqrt{x/100}$ , os demais dados foram transformados em  $\sqrt{x+1}$ .

Sintomas da doença foram observados nas plantas 24 horas após a inoculação nos três ensaios. Lesões necróticas de coloração marrom e circulares formam-se nos tecidos ao redor do ponto de inserção do palito. Nas testemunhas, não foram observados quaisquer sintomas. Existem poucas informações na literatura sobre ataque da *S. sclerotiorum* em espécies de crotalária a primeira ocorrência natural foi registrada no Brasil foi realizada por Oliveira et al. (2015) no sul do estado do Paraná, em junho de 2013, quando foram observadas lesões necróticas em *C. spectabilis*, em

18,6% das plantas avaliadas no campo. O sintoma foi, inicialmente, encharcamento, evoluindo para lesão necrótica em hastes, pecíolos e vagens, resultando posteriormente em morte. Os autores observaram crescimento de micélio branco cotonoso, cobrindo as áreas necróticas e adjacentes, posteriormente observaram a formação de grande número de escleródios de cor preta, variando de 2,0 a 7,5 mm de comprimento.

Os valores mais altos de AACPD correspondem a *C. ochroleuca* e *C. paulina* já que todas as plantas morreram para primeira espécie. A elevada incidência de plantas mortas em *C. paulina* pode ser explicada por características da própria espécie, como a lignificação do seu caule. Segundo Kolkman e Kelly (2002), pois o teor de lignina é uma característica que influi no desenvolvimento da doença, neste contexto pode-se levar hipótese de que as espécies possuem teores de lignina diferentes entre si.

*C. grahamiana* e *C. breviflora* apresentaram, menores valores de índice de doença e de AACPD, mesmo assim mostraram-se suscetíveis como as demais espécies de crotalárias, já que algumas plantas quebraram no ponto de inserção do palito. No entanto não houve progressão da doença, sendo que estas plantas emitiram ramos laterais, seguindo assim seu ciclo (Figura 5). Em plantas de *C. breviflora*, observaram-se a quebra no ponto de inoculação, com a parte superior permanecendo aderida à planta. Neste caso, o patógeno continuou a colonizar os tecidos e a lesão expandiu-se na parte superior ainda aderida à planta. Estas plantas emitiram ramos laterais.

Em *C. incana* houve a quebra no ponto de inoculação da haste na maioria das plantas. No entanto, a taxa de mortalidade foi baixa, diferentemente de *C. ochroleuca*, onde observou-se 100% de mortalidade. Nas plantas testemunhas, de todas as espécies avaliadas, não se observou a quebra da haste no ponto de inserção do palito.

Em relação à massa de escleródios, os menores valores, sem diferenças significativas entre eles pelo Teste de LSD Fisher a 5%, correspondem a *C. grahamiana* e *C. breviflora*. Os maiores valores correspondem a *C. ochroleuca* e *C. juncea*, o que significa que nas áreas infestadas com nematoides das galhas, com condições favoráveis para o desenvolvimento de mofo branco, o uso dessas espécies pode resultar em aumento do potencial de inóculo na área.





FIGURA 5. *Crotalaria grahamiana* apresentando ruptura do caule em função do ataque da *S. Sclerotiorum* e emissão de brotos laterais. Dourados, MS, 2017.

A avaliação de a massa seca de folha e de caule de crotalária foram obtidos apenas no primeiro ensaio (Quadro 2). Os valores nulos para a *C. ochroleuca* ocorreram devido às plantas terem morrido em função do ataque do patógeno. Verificou-se que *C. anagyroides* e *C. paulina* apresentaram os valores mais baixos de massa de caule e de folha, já que muitas plantas morreram devido á doença. Os demais resultados correspondem, com aqueles da avaliação de doença; *C. juncea*, *C. incana* e *C. spectabilis* apresentaram valores médios de massa de folhas, pois a maioria, das plantas quebraram, enquanto que a *C. grahamiana* apresentou os valores mais altos de massa de folhas, já que depois de quebrada continuou ramificando e produzindo folhas, que também ocorreu com a *C. breviflora*.

Os altos valores para massa de caule observados na *C. juncea* devem-se dinâmica de crescimento da planta onde esta apresenta um crescimento acelerado e com caule bastante lignificado. As espécies que apresentaram os menores valores de massa de caule correspondem com as que apresentaram menores os valores de massa de folhas, sendo elas; *C. paulina*, *C. ochroleuca* e *C. anagyroides*.

Não houve diferenças significativas entre *C. grahamiana* inoculada e não inoculada, e entre *C. breviflora* inoculada e não inoculada. Também não houve diferenças significativas entre as plantas com e sem inoculação de *C. incana*, pois



embora as maiorias, das plantas inoculadas tenham quebrado, a produção de folhas continuou.

QUADRO 2. Massa seca (MS) de folha e massa seca de caule, em espécies de Crotalária submetidas à inoculação com *S. sclerotiorum*, primeiro ensaio. Dourados, MS, 2017.

Espécies	Folha (g)			
	INOC		NI	
<i>C. anagyroides</i>	2,43	dA	25,29	aB
<i>C. breviflora</i>	18,58	abA	18,60	abA
<i>C. grahamiana</i>	18,72	aA	20,67	abA
<i>C. juncea</i>	14,79	bcA	27,46	aA
<i>C. ochroleuca</i>	0,00	dA	18,48	abB
<i>C. paulina</i>	4,97	cA	11,81	bB
<i>C. incana</i>	15,27	abcA	19,53	abA
<i>C. spectabilis</i>	10,32	cA	17,96	abB
CV(%)	27,42			

Espécies	Caule (g)			
	INOC		NI	
<i>C. anagyroides</i>	2,28	cdA	30,99	aB
<i>C. breviflora</i>	18,17	aA	18,46	cdA
<i>C. grahamiana</i>	20,99	aA	28,09	abA
<i>C. juncea</i>	27,01	aA	31,66	aA
<i>C. ochroleuca</i>	0,00	dA	24,09	abcB
<i>C. paulina</i>	5,89	bcA	15,13	dB
<i>C. incana</i>	21,63	aA	25,48	abcA
<i>C. spectabilis</i>	9,34	bA	20,00	abcB
CV(%)	26,82			

Médias seguidas por letras iguais minúscula na coluna e de maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste LSD Fisher a 5% de probabilidade. Os dados foram transformados em  $\sqrt{x + 1}$ .

Crotalárias são em sua maioria, plantas caracteristicamente de cobertura usadas em esquemas de rotação de culturas. Os danos causados por *S. sclerotiorum* poderão interferir no potencial produtivo e, principalmente, reduzir os benefícios que estas plantas possam proporcionar aos sistemas. Crotalárias são utilizadas como finalidade de recuperação dos atributos físicos do solo e da fertilidade do solo, e também possui grande potencial no manejo das doenças de plantas e no manejo de população de plantas daninhas. Estas plantas de cobertura podem aumentar a adição de matéria orgânica solo, conseqüentemente, estimular o desenvolvimento de microflora antagonica que propicia o controle biológico de patógenos. Kluthcouski et al. (2003)

relataram que a palhada de soja favorece a proliferação de *Sclerotinia sclerotiorum*. No entanto a palhada de *Brachiaria* sp. conteve a progressão da doença em feijoeiro (AIDAR e FERREIRA, 1996). Görge et al. (2009), avaliando o manejo do mofo branco da soja com palhada de *Brachiaria ruziziensis* e *Trichoderma harzianum* '1306' observou que este manejo contribuiu para menor incidência da doença. Em áreas que foi associado com controle biológico, o número de escleródios parasitados por *Trichoderma spp.* foi maior na presença de palhada.

No segundo ensaio, alguns resultados obtidos, não foram evidentes comparados ao primeiro e terceiro, por influência climática. A baixa incidência da doença em *C. incana* ocorreu devido ao não estabelecimento do patógeno durante as primeiras horas após a inoculação, provavelmente, influenciada por fatores ambientais e, também, pela qualidade do inóculo no palito. Em geral, observa-se, que os valores de índices de doença e AACPD apresentam-se menores, e coeficientes de variações elevados (Quadro 3).

O experimento foi conduzido em época do ano em que as temperaturas máximas atingiram valores superiores a 32 °C (Figura 6 A.) durante os cinco dias após a inoculação e com uma temperatura média de 27 °C (Figura 6 B.). Segundo Abawi e Grogan (1975), sob temperatura acima de 30°C não ocorre desenvolvimento do micélio de *S. sclerotiorum*, nem o início da infestação e expansão da lesão. Em condições ideais de umidade, o patógeno pode colonizar tecidos sadios entre 16 e 24 horas após a infecção do tecido floral senescente. Em condições desfavoráveis, principalmente em tempo seco, o progresso da doença pode ser retardado, pois o micélio pode permanecer viável por até 144 horas podendo retomar o crescimento em condições ideais (HARIKRISHNAN e DEL RÍO, 2006).

Neste estudo *C. anagyroides* apresentou os menores valores de índice de doença e AACPD, porém não diferiu em relação a *C. grahamiana*, *C. incana* e *C. juncea*. Os valores mais altos correspondem a *C. paulina*, *C. ochroleuca*, o que foi semelhante ao observado na primeira avaliação, sendo que a maioria, das plantas dessas espécies morreu. Os valores mais altos de massa de escleródios foram para *C. ochroleuca*, *C. paulina*, *C. incana* e *C. spectabilis*, indicando que essas espécies podem aumentar o inóculo na área.

QUADRO 3. Incidência de plantas com lesão (%), índice de doença McKinney, área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD), massa de escleródios e plantas mortas (%) em espécies de *Crotalaria* inoculadas com *S. sclerotiorum*, segundo ensaio. Dourados, MS, 2017.

Espécies	Incidência de plantas com lesão (%)	Índice de doença McKinney	AACPD	Massa de escleródios (g)	Plantas Mortas (%)
<i>C. anagyroides</i>	100,0 b	40,6 a	654,7 a	0,04 ab	25,0 a
<i>C. breviflora</i>	100,0 b	76,6 bc	1610,9 cd	0,08 ab	0,0 a
<i>C. grahamiana</i>	100,0 b	64,1 abc	1335,9 bcd	0,07 ab	0,0 a
<i>C. incana</i>	75,0 a	57,8 ab	1010,9 ab	0,20 abc	37,5 ab
<i>C. juncea</i>	100,0 b	53,1 ab	1037,5 abc	0,03 a	37,5 ab
<i>C. ochroleuca</i>	100,0 b	98,4 c	1979,7 d	0,31 c	87,5 b
<i>C. paulina</i>	100,0 b	93,8 c	1890,6 d	0,22 bc	87,5 b
<i>C. spectabilis</i>	87,5 ab	71,9 bc	1421,9 bcd	0,21 abc	25,0 a
CV%	22,4	34,0	38,4	5,7	73,19

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste LSD de Fisher a 5% de probabilidade. Os dados de porcentagem foram transformados em  $\arcsen \sqrt{x/100}$ , os demais dados foram transformados em  $\sqrt{x+1}$ .

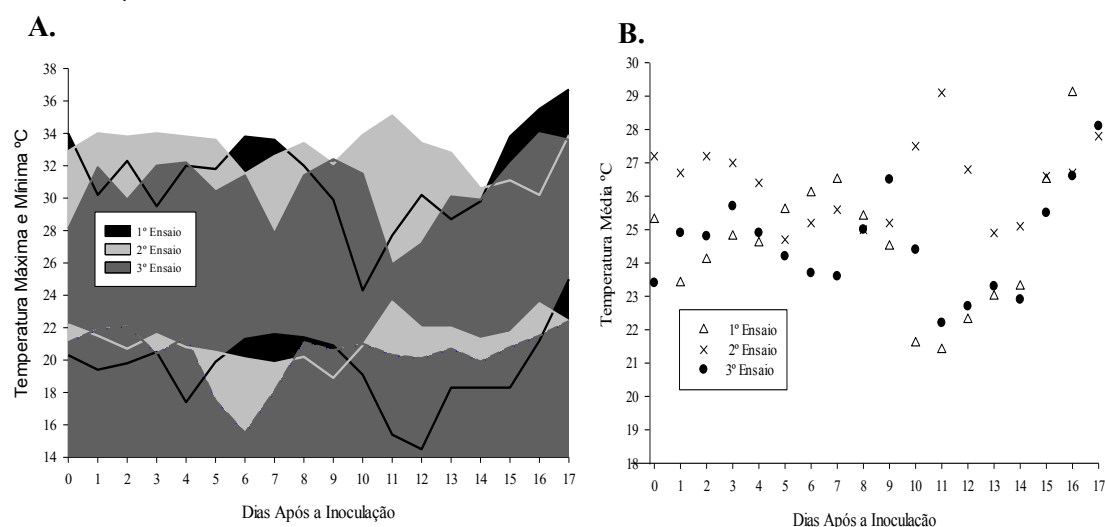


FIGURA 6. **A.** Temperatura máxima (parte superior da figura) e temperatura mínima (inferior da figura). **B.** temperatura média 17 dias após a inoculação dos três ensaios. Dourados, MS, 2017.

Diferentemente dos ensaios anteriores, o terceiro ensaio considerou plantas mortas todas as plantas com caule quebrado no ponto de inoculação. Neste ensaio, utilizaram-se duas espécies que outrora não foi possível usá-las (*Crotalaria pallida* e *C. lanceolata*), as quais foram encontradas na região de Itaquiraí no estado do Mato Grosso do Sul, mas também estão dispersas em todo território nacional. As duas espécies apresentaram mortalidade de 96,88 e 93,75%, com produção média de 9,3 e 8

escleródios por planta, respectivamente, apresentando escleródios com peso médio de 0,019 gramas por escleródios. Os dados apresentados neste terceiro ensaio confirmam parte dos resultados apresentados nos dois anteriores, com a *C. grahamiana*, mostrando resistência quando comparada às demais crotalária. Os dados de AACPD da *C. grahamiana* foram significativamente diferentes pelo teste LSD Fisher 5% de probabilidade entre todas as demais. Quanto à taxa de mortalidade apenas a espécie *C. juncea* não diferiu estatisticamente da *C. grahamiana* (Quadro 4).

As espécies *C. breviflora* e *C. incana* apresentaram resultados variáveis dos dois ensaios iniciais, sendo neste terceiro ensaio estas espécies tiveram um taxa de mortalidade alta, comparada, com as anteriores. Analisando todos os tratamentos, observa-se a mesma tendência para todas as espécies. Estas respostas estão relacionadas com o método de avaliação que foi realizado, diferentemente para taxa de mortalidade. Outro fator que pode ter contribuído para os altos índices de mortalidade, foram às condições climáticas. No período de inoculação e avaliações, registraram-se temperaturas amenas, com médias de 24°C, 79% de umidade relativa do ar e com precipitação de 138 mm. Estes fatores propiciaram para que as temperaturas no interior da casa de vegetação permanecessem ideais para o desenvolvimento do patógeno.

QUADRO 4. Área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD), mortalidade (%) em espécies de crotalária inoculadas com *S. sclerotiorum*, terceiro ensaio. Dourados, MS, 2017.

Espécies	AACPD	Mortalidade (%)
<i>C. anagyroides</i>	1089,59 bcd	93,75 d
<i>C. breviflora</i>	1201,57 d	100,00 d
<i>C. grahamiana</i>	784,48 a	46,88 a
<i>C. incana</i>	1071,07 bcd	93,75 d
<i>C. juncea</i>	942,00 bc	65,63 ab
<i>C. lanceolata</i>	1126,44 cd	93,75 d
<i>C. ochroleuca</i>	1154,30 cd	96,88 d
<i>C. pallida</i>	1186,60 cd	96,88 d
<i>C. paulina</i>	1028,07 bc	71,88 bc
<i>C. spectabilis</i>	1070,26 bcd	87,5 cd
<b>CV (%)</b>	7,81	18,22

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste LSD Fisher 5% de probabilidade. Os dados de porcentagem foram transformados em  $\arcsen \sqrt{x/100}$ , os demais dados foram transformados em  $\sqrt{x + 1}$ .

A incidência de plantas inoculadas com formação de escleródios na superfície e no seu interior foi avaliada no terceiro experimento. *Crotalaria grahamiana*

e *C. juncea*, apresentando menor incidência que as demais espécies (Quadro 5). A tendência seguiu para as demais variáveis, exceto para a massa média de escleródios onde *C. spectabilis* obteve os escleródios de maiores massa, 0,027 g, diferente significativamente apenas de *C. grahamiana* e *C. breviflora* com 0,017 e 0,013 g. Além de apresentarem as maiores massa por escleródio, *C. spectabilis* obteve-se a maior massa total de escleródio juntamente com *C. ochroleuca*.

QUADRO 5. Plantas com escleródios (%), massa de escleródios (g), número de escleródios, massa por escleródio e número de escleródio por planta em espécies de crotalária inoculadas com *S. sclerotiorum*, terceiro ensaio. Dourados, MS, 2017.

Espécies	Plantas com escleródios (%)	Massa total (g)	Número de escleródio	Massa escleródio (g)	Número de escleródio / Planta
<i>C. anagyroides</i>	96,9 b	0,547 bc	34,0 cd	0,015 ab	8,7 bcd
<i>C. breviflora</i>	96,9 b	0,496 ab	35,4 cd	0,013 a	9,1 bcd
<i>C. grahamiana</i>	50,0 a	0,261 a	11,8 a	0,017 a	4,3 a
<i>C. incana</i>	96,9 b	0,445 ab	25,6 bc	0,018 ab	6,7 bc
<i>C. juncea</i>	62,5 a	0,374 ab	17,8 ab	0,024 ab	6,3 ab
<i>C. lanceolata</i>	93,8 b	0,561 bc	30,4 cd	0,019 ab	8,0 bcd
<i>C. ochroleuca</i>	96,9 b	0,858 cd	43,0 d	0,019 ab	10,9 d
<i>C. pallida</i>	96,9 b	0,585 bc	35,0 cd	0,019 ab	9,3 cd
<i>C. paulina</i>	87,5 b	0,547 bc	32,6 cd	0,017 ab	9,3 bcd
<i>C. spectabilis</i>	87,5 b	1,002 d	36,8 cd	0,027 b	10,5 d
CV(%)	17,02	9,57	21,76	0,53	18,45

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste LSD Fisher 5% de probabilidade. Os dados de porcentagem foram transformados em  $\arcsin \sqrt{x/100}$ , os demais dados foram transformados em  $\sqrt{x+1}$ .

Pelos resultados apresentados nos diversos ensaios e sabendo que os materiais apresentam população heterogênea, pois estes não passaram por uma seleção genética, alguns sintomas indicaram possível variabilidade genética, sendo que várias espécies apresentaram plantas isoladas com grau de resistência ao patógeno. Esta resistência podendo ser, pré ou pós-formada sendo ela, estrutural, fatores de resistência bioquímicos, reação de hipersensibilidade ou resistência induzida (AGRIOS, 2005) (Figura 7).

Um dos agentes químicos envolvidos na interação patógeno x hospedeiro é o oxalato. Avaliando os mecanismos fisiológicos do ácido oxálico durante a infecção por *Sclerotinia sclerotiorum*, é possível observar que a explosão oxidativa é suprimida

na presença do oxalato produzido pelo fungo. A explosão oxidativa é uma resposta de defesa da planta após o reconhecimento do patógeno, conduzindo à reação de hipersensibilidade (HR) (RESENDE et al., 2003). Linhagens mutantes de *S. sclerotiorum* deficientes na produção do oxalato, foram incapazes de induzir a explosão oxidativa em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), não causando doença (GODOY et al., 1990; CESNNA et al., 2000).

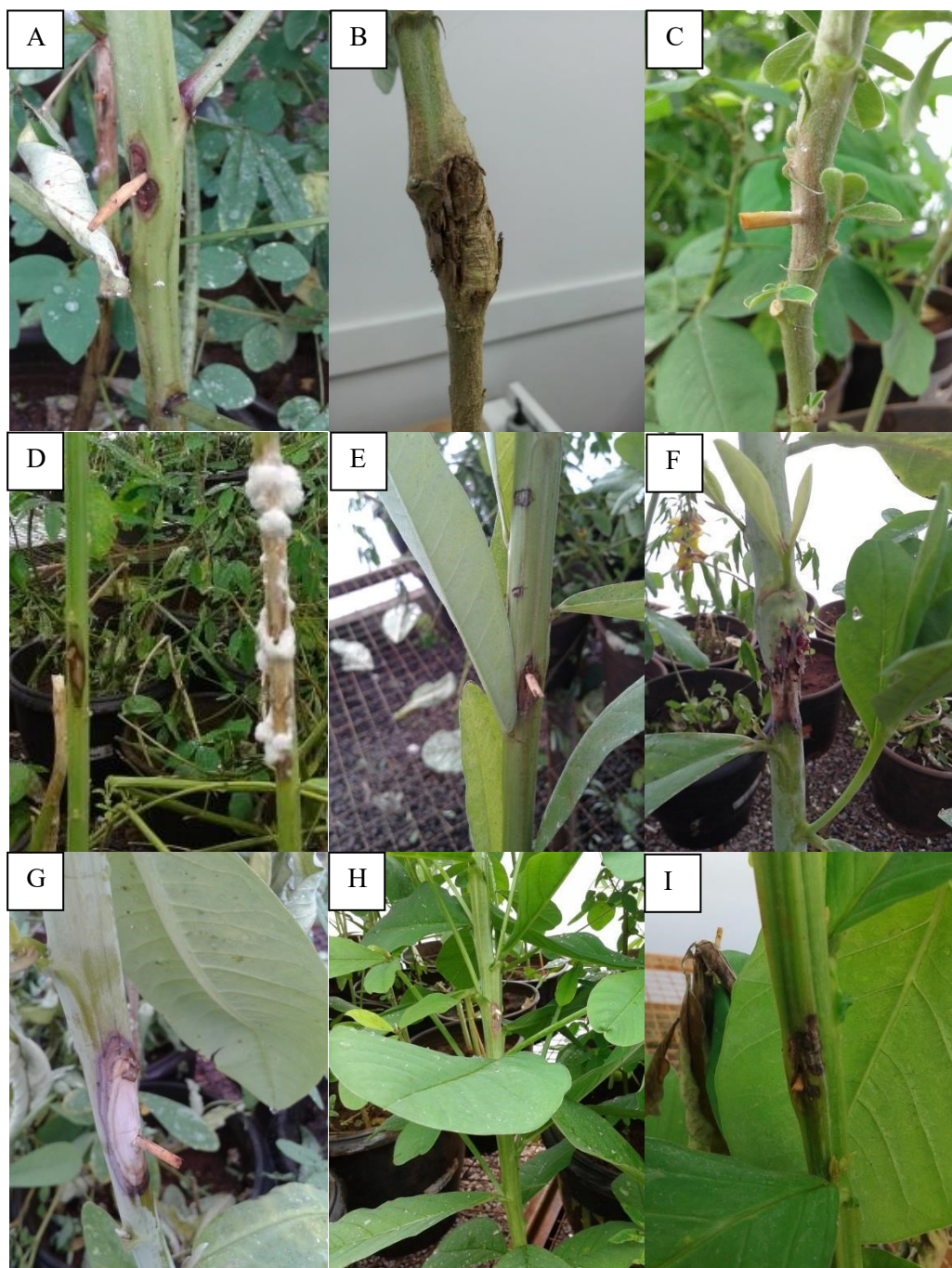


FIGURA 7 Sintomas e sinais em diferentes espécies de crotalária inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum*. A. *C. incana*, B., C. *C. grahamiana*, D., E.. *C. juncea*, F., G. *C. paulina* e H., I. *C. spectabilis*. Dourados, MS, 2017.

Os agentes causadores de doenças como os fungos ativam uma resistência na planta que é conhecida como resistência sistêmica adquirida (SAR). No entanto, a resposta depende do patógeno envolvido. Para que ocorra SAR, a infecção inicial é necessária resultar em lesões necróticas, decorrentes da reação de hipersensibilidade da planta, pelo próprio sintoma da doença ou por agentes químicos. É de suma importância conhecer as interações, patógeno x hospedeiro, e os mecanismos envolvidos, para que possamos inferir e sugerir qual o caminho a seguir em novos ensaios.

Vários pesquisadores constataram o desenvolvimento de sintomas semelhantes aos causados pelo patógeno após a aplicação de ácido oxálico ou filtrados de cultivo do fungo contendo ácido oxálico (BATEMAN e BEER, 1965; MARCIANO, et al., 1983; CESNNA et al., 2000). Antonio et al. (2008) desenvolveram o método do ácido oxálico para testar a resistência de planta a *Sclerotinia sclerotiorum*. Todos os trabalhos realizados comparando esta metodologia com os métodos de inoculação tradicionais obtiveram resultados semelhantes (HÜLLER, et al., 2016). Este mecanismo da secreção do oxalato pelo patógeno pode realçar a virulência de *S. sclerotiorum*. O oxalato pode favorecer as enzimas secretadas pelo fungo durante a invasão do tecido da planta como a poligalacturonase, que tem atividade máxima em baixos pH. Ele também pode ser diretamente tóxico às plantas hospedeiras, pela sua baixa acidez e o ânion oxalato pode quelatizar  $\text{Ca}^{2+}$ , comprometendo a função do  $\text{Ca}^{2+}$ , enfraquecendo a parede celular da planta (BATEMAN e BEER, 1965).

As alternativas utilizadas para o desenvolvimento de plantas resistentes são o uso de seleção genética mesmo que esta tenha baixa herdabilidade e está restrita a genótipos que apresentam apenas resistência parcial (VUONG et al., 2004; JULIATTI et al., 2014) e o desenvolvimento de plantas transgênicas que possam ser capazes de degradar o ácido oxálico usando os genes *oxo* que codificam para a enzima oxalato oxidase e do gene *oxdc* que codifica para a enzima oxalato descarboxilase (LEVINE et al., 1994; KESARWANI et al., 2000; DONALDSON et al., 2001).

### **Avaliação da metodologia de inoculação com flores colonizadas**

Nos Quadros 6 e 7 encontram-se os resultados do ensaio de avaliação de inoculação de folhas destacadas de *C. anagiroides*. Não se observou diferenças entre a inoculação na face abaxial ou na face adaxial das folhas, exceto para a primeira avaliação com pétalas expostas por 96 h a *S. sclerotiorum*. Na última avaliação, a

inoculação com disco de micélio apresentou o valor mais alto, seguidos por folíolos inoculados com flores com 72 h e 48 h de incubação com micélio, respectivamente. Os valores mais baixos correspondem a o tratamento de 24 h e 96 h de incubação, já que no tratamento de 24 h, o micélio ainda tinha tecido nutritivo da flor e começou a colonizar a folha só um tempo depois, e no tratamento de 96 h já tinha começado a formação de escleródios nas flores.

QUADRO 6. Área foliar lesionada (%), em folhas destacadas e inoculadas com flores, em função do tempo de exposição das flores a *S. sclerotiorum* e com disco de micélio, nas faces abaxial e adaxial das folhas. Dourados, MS, 2017.

Tratamento	DIA 1		DIA 2	
	Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial
24HIF	22,5 abcA	22,5 bcA	22,5 b	35,8 b
48HIF	36,3 bcA	53,8 aA	61,3 a	81,3 a
72HIF	45,0 cA	41,3 abA	56,3 a	56,3 ab
96HIF	13,8 abA	51,3 aB	37,5 ab	58,8 ab
Disco de Micélio	32,5 bcA	55,0 aA	47,5 a	60,3 ab
CV(%)	41,95		30,34	
Tratamento	DIA 3		DIA 4	
	Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial
24HIF	25,0 c	38,8 b	38,8 cA	70,8 aB
48HIF	65,0 ab	91,3 a	78,8 abA	96,3 aA
72HIF	60,8 ab	57,0 ab	89,5 abA	72,5 aA
96HIF	47,5 c	67,0 a	53,8 cdA	81,3 aA
Disco de Micélio	85,8 a	83,8 a	100,0 aA	99,0 aA
CV(%)	26,5		23,8	

Médias seguidas por letras iguais minúscula na coluna e de maiúscula na linha para cada dia de avaliação, não diferem entre si pelo teste LSD Fisher a 5% de probabilidade. Os dados de porcentagem foram transformados em  $\text{arc sen } \sqrt{x/100}$ .

Os maiores valores de AACPD correspondem ao tratamento com disco de micélio, de 48 e 72 horas, e os menores valores correspondem ao tratamento de 24 e 96 horas de exposição. No tratamento de 24 h não se observou formação de escleródios. O uso desta metodologia poderá facilitar os testes de resistência com diversas espécies e também mostra que mesmo após a flor infectada pelo fungo e em algum caso quando ocorre uma queda natural das mesmas, estas podem entrar em contato com a face adaxial das folhas causando uma infecção na planta. Garcia e Juliatti (2012), trabalhando com inoculação de órgãos destacados e na planta, para avaliar genótipos de soja obtiveram uma correlação significativa entre as duas metodologias. Os autores



destacaram que com este método, da folha destacada, pode-se estudar a reação de genótipos, com economia de tempo, espaço e material, comparando-se com o método de inoculação na planta. Um método efetivo, fácil, econômico e que possa ser repetido, permite identificar resistência ao mofo branco. A efetividade do método de inoculação depende da idade da planta e órgão inoculado; agressividade do patógeno inoculado; se é micélio ou ascósporos que são inoculados; do método de inoculação; quantidade de inoculo; duração do contato entre o inoculo e a planta; tempo de crescimento do patógeno na planta; avaliação do comprimento da lesão; avaliação de incidência versus severidade; tempo entre inoculação e início da avaliação (SINGH e TERÁN, 2008).

QUADRO 7. Área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD) e massa de escleródios, em folhas destacadas e inoculadas com flores, em função do tempo de exposição das flores a *S. sclerotiorum* e com disco de micélio, nas fases abaxial e adaxial das folhas. Dourados, MS, 2017.

Tratamentos	AACPD		Massa de Escleródios (g)	
	Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial
Testemunha	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 bA
24HIF	78,1 bA	121,1 bA	4,3 cA	2,5 aB
48HIF	183,8 cA	247,5 cA	1,8 bA	2,3 aA
72HIF	184,3 cA	170,1 bcA	2,5 bA	2,5 aA
96HIF	118,8 cA	192,0 bcA	2,5 bA	2,0 aA
Disco de Micélio	199,5 cA	221,0 cA	0,0 aA	0,0 bA
CV(%)	25,5		14,9	

Médias seguidas por letras iguais minúscula na coluna e de maiúscula na linha para cada variável, não diferem entre si pelo teste LSD Fisher a 5% de probabilidade. Os dados foram transformados em  $\sqrt{x + 1}$ .

Os tecidos das flores atuam como fonte de energia para que o patógeno seja capaz de infectar os tecidos saudáveis, como frutas e folhas. Os ascósporos de *S. sclerotiorum* não conseguem infectar tecido sadio sem uma fonte exógena de nutrientes (ABAWI e GROGAN, 1975). No campo, as flores infestadas com ascósporos podem cair sobre as faces adaxiais das folhas e assim ocorrer à infecção através dessas flores.

Hoyte (2000) durante pesquisa de campo dois pomares kiwis observou uma correlação entre tecidos florais aderidos, e o desenvolvimento da doença. A incidência de frutos doentes e cicatrizes de frutos foram significativamente reduzidas quando os tecidos florais foram fisicamente removidos após a queda de pétalas. Os dados sugerem que os tecidos florais são prontamente colonizados pelos ascósporos de *S. sclerotiorum*

durante o período de florescimento a doença surge diretamente da infecção micelial originada nos tecidos florais aderidos a partir da germinação do ascósporo na superfície dos tecidos florais.

Atallah e Johnson (2004), também observaram que a remoção da flor antes da sua queda, reduziu drasticamente a incidência da doença em comparação com as plantas de batata não foram removidas. Do mesmo modo, a presença de ascósporos em pétalas de flores de canola foi positivamente correlacionada com a infestação de pétalas em condições favoráveis para a infecção (TURKINGTON e MORRALL, 1993). Young e Werner (2012), trabalhando com plantas de linhagem apétalas de *B. napus* e com sua isogênica, que produzia pétalas normais observaram que plantas apétalas não evitou a infecção completamente, provavelmente porque produziu algumas pétalas, e as lesões foram iniciadas a partir de estames aderidos. Não houve diferenças entre as duas linhagens, no entanto ainda se busca estabilidade genética para conferir caracteriza de exclusão de pétala. Esta característica funciona como mecanismos de escape para controlar a doença.

Em soja, Cline e Jacobsen (1983) avaliaram diferentes métodos, com suspensão de ascósporos e com inoculação de cenoura infestada, e a inoculação com pétalas infectadas com o fungo e colocadas no segundo nó das plantas e removida 24 horas depois, observaram diferenças na resistência de 10 cultivares de soja. A remoção precoce do inóculo do segundo nó da planta pode reduzir a severidade da doença. Em plantas com flores inoculadas com ascósporos, de *S. sclerotiorum*, foi observada alta incidência de doença, entretanto não houve diferenças significativas entre as cultivares. Kull et al. (2003) utilizaram três métodos de inoculação, o método da inoculação de cotilédones, o teste do *canudo*, onde o micélio do fungo é fixado no ápice cortado da planta, e o método da folha destacada em que são cortadas as folhas mais novas e o micélio do fungo é fixado na inserção do pecíolo com o caule, em plantas de feijão, e observaram que o método da folha destacada não correlacionou com os demais métodos, diferentemente dos resultados apresentando para a cultura da soja.

Garg et al. (2010), testando inoculação de *S. sclerotiorum* em 32 genótipos de *Brassica napus*, usando micélio macerado (104 fragmentos miceliais / mL) sob condições ambientais controladas, observaram diferenças significativas entre os genótipos de *B. napus*. As respostas dos genótipos entre três métodos de inoculação foram correlacionadas significativamente e positivamente, o que indicou que este teste

pode ser aplicado com sucesso para obter resultados em tempo menor, comparados com os demais.

A utilização de ascósporos como método de inoculação, não é comum pela dificuldade de obtê-los e o resultado nem sempre serem bem sucedidos. Por isso, a inoculação com ascósporo não é muito utilizada como uma técnica de inoculação (KULL et al., 2003). Segundo Abawi e Grogan (1975), o sucesso dos métodos de inoculação depende da variabilidade dos isolados do fungo e da sensibilidade do patógeno às altas temperaturas. Ele avaliou o crescimento do micélio em diferentes temperaturas e os resultados foram que o crescimento micelial é ótimo entre 25- 30°C, e que acima de 30°C não ocorre desenvolvimento do micélio. Em folhas destacadas inoculadas com fungo, não ocorreu lesão com temperaturas acima de 30°C. A temperatura e a umidade têm efeitos significativos na formação de apotécios, germinação de esporos e na iniciação da infecção e expansão da lesão.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta pesquisa permitem concluir:

1. Das espécies de crotalária avaliadas, todas podem ser consideradas suscetíveis a *S. sclerotiorum*, entretanto a *C. grahamiana* exibe maior tolerância que as demais espécies.

2. *Crotalaria breviflora*, mesmo com morte de algumas plantas, ainda continuou seu desenvolvimento no primeiro ensaio. Nos demais ensaios e em condições ótimas para o patógeno, apresentou alta suscetibilidade.

3. As espécies *Crotalaria paulina*, *C. grahamiana*, *C. anagiroydes*, *C. spectabilis*, *C. juncea* e *C. lanceolata* apresentaram plantas com sintomas de resistência à *S. sclerotiorum*, com potencial para seleção com teste de progênie.

4. Na metodologia de inoculação de folhas com flores colonizadas, há necessidade de 48 a 72 horas de incubação das flores, junto ao fungo, para eficiente inoculação das folhas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. New York: Academic Press, 2005. 922 p.
- AIDAR, H.; FERREIRA, P. R. C. Apresentação. In Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão. Embrapa CNPAF. **Anais (Documentos 69)**, 1996.
- ANTÔNIO, R. P.; SANTOS, J. B.; SOUZA, T. P.; CARNEIRO, F. F. Genetic control of the resistance of common bean to white mold using the reaction to oxalic acid. **Genetics and Molecular Research**. Ribeirão Preto, v. 7, n. 3, p. 733-740, 2008.
- ATALLAH, Z. K.; JOHNSON, D. A. Development of Sclerotinia stem rot in potato fields in South-Central Washington. **Plant Disease**, Saint Paul . v.88, p. 419- 423, 2004.
- ABAWI, G. S.; GROGAN, R. G. Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 65, n. 6, p. 673-678, 1975.
- BATEMAN, D. F.; BEER, S. V. Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis of *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 55, p. 204–211, 1965.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.
- CESSNA, S. G.; SEARS, V. E.; DICKMAN, M. B.; LOW, P. S. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. **Plant Cell**, Waterbury, v. 12, n. 11, p. 2191-2199, 2000.
- CHAVES, G. M. Estudos sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Experientiae**, Viçosa, v. 4, n. 2, 1964. 133p.
- CLARKSON, J. P., PHELPS, K., WHIPPS, J. M., YOUNG, C. S., SMITH, J. A.,; WATLING, M. Forecasting Sclerotinia disease on lettuce: Toward developing a prediction model for carpogenic germination of sclerotia. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 03, p. 268-279, 2004.
- CLINE, M. N.; JACOBSEN, B. J. Methods for evaluating soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, p. 784-786, 1983.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento da Safra Brasileira Grãos, Safra 2016/17**. Terceiro Levantamento, Brasília, v. 4, n.3, p. 1-156, 2016. Disponível em:<[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_12\\_22\\_12\\_08\\_27\\_boletim\\_graos\\_dezembro\\_2016.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_12_22_12_08_27_boletim_graos_dezembro_2016.pdf)>. Acesso em: \_10 jan. 2016.
- COSTA, J. L. S.; SILVEIRA, P. M. Influência dos métodos de preparo do solo e rotação de culturas na ocorrência de podridões radiculares de feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 258, 1997.

- DEVECCHI, M. F.; PIRANI, J. R.; MELO-DE-PINNA, G. F. A. Comparative leaf anatomy and morphology of some Brazilian species of *Crotalaria* L. (Leguminosae: Papilionoideae: Crotalariaeae). **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 28, n. 4, p. 583-593, 2014.
- DONALDSON, P. A.; ANDERSON, T.; LANE, B. G.; DAVIDSON, A. L.; SIMMONDS, D. H. Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat *gf-2.8* (*germin*) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Amsterdam v. 59, n. 6, p. 297–307, 2001.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- GARCIA, J. M.; KAWAKITA, K.; MIOTTO, S. T. S.; SOUZA, M. C. de. O gênero *Crotalaria* L. (Leguminosae, Faboideae, Crotalariaeae) na Planície de Inundação do Alto Rio Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 209-226, 2013.
- GARCIA R. A.; JULIATTI, F. C. Avaliação da resistência da soja a *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes estádios fenológicos e períodos de exposição ao inoculo. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 37, n. 3, p. 196-203, 2012.
- GARG, H.; LI, H.; SIVASITHAMPARAM, K.; KUO, J.; BARBETTI, M. The infection processes of *Sclerotinia sclerotiorum* in cotyledon tissue of *Brassica napus* is affected in a tolerant genotype. **Annals of Botany**, London, v. 106, n. 6, p. 897-908, 2010.
- GÁSPERI, A. C.; PRESTES, A. M.; COSTAMILAN, L. M. Reação de cultivares de soja à podridão vermelha da raiz causada por *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília v. 28, n. 5, p. 544-547, 2003.
- GODOY, G.; STEADMAN, J. R.; DICKMAN, M. B.; DAM, R. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, East Lansing, v. 37, n. 3, p. 179-191, 1990.
- GÖRGEN, C. A.; LOBO JUNIOR, M.; SILVEIRA NETO, A. N.; CARNEIRO, L. C.; RAGAGNIN, V. A. Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 12, p. 1583-1590, 2009.
- HARIKRISHNAN, R.; DEL RÍO, L. E. Influence of temperature, relative humidity, ascospore concentration, and length of drying of colonized dry bean flowers on white mold development. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, n. 7, p. 946-950, 2006.
- HOYTE, S. The role of adhering floral tissues in sclerotinia disease of kiwifruit. **New Zealand Plant Protection**, Christchurch, v. 53, p. 138-142, 2000.
- HÜLLER, G. C.; JACCOUD FILHO, D. S.; PIERRE, M. L. C.; TULLIO, H. E.; GRABICOSKI, E. M. G.; JULIATTI, F. C. Different methods of assessing

susceptibility of soybean genotypes to white mold. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 32, n. 2, p. 389-402, 2016.

JULIATTI, F. C.; SAGATA, E.; JACCOUD FILHO, D. S.; JULIATTI, B. C. M. Métodos de inoculação e avaliação da resistência de genótipos de soja à *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 4, p. 958-968, 2014.

JULIATTI, F. C.; FIGUEIRÓ, A. A.; GARCIA, R. A.; SANTOS, J. B. DOS; MACHADO, J. C.; POZZA, E. A.; JUNIOR, M. L.; CIVARDI, E. A.; JÚNIOR, T. J. P.; VIEIRA, R. F.; LEHNER, M. S.; LIMA, R. C.; JACCOULD-FILHO, D. S. *Sclerotinia sclerotiorum* e Mofo branco: Estudos básicos e aplicados. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Brasília, v. 23, p. 159-194, 2015.

KESARWANI, M.; AZAM, M.; NATARAJAN, K.; MEHTA, A.; DATTA, A. Oxalate decarboxylase from *Collybia velutipes*: molecular cloning and its overexpression to confer resistance to fungal infection in transgenic tobacco and tomato. **The Journal of Biological Chemistry**, Maryland, v. 275, n. 10, p. 7230-7238, 2000.

KLUTHCOUSKI, J.; YOKOYAMA, L. P.; STONE, L. F. Fazendas de referência na integração lavoura-pecuária. In: KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L.F.; AIDAR, H. (Ed.). **Integração lavoura-pecuária Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e feijão**, p. 535-554, 2003.

KULL L. S.; VUONG, T. D.; POWERS, K. S.; ESKRIDGE, K. M.; STEADMAN, J. R., HARTMAN, G. L. Evaluation of resistance screening methods for *Sclerotinia* stem rot of soybean and dry bean. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, n. 12, p. 1471-1476, 2003.

KOLKMAN, J. M.; KELLY, J. D. Agronomic traits affecting resistance to white mold in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 3, p. 693-699, 2002.

LEVINE, A.; TENHAKEN, R.; DIXON, R.; LAMB, C. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, Cambridge, v. 79, n. 4, p. 583-593, 1994.

LE TOURNEAU, D. Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 887-890, 1979.

LUMSDENR, D. Histology and physiology of pathogenesis in plant diseases caused by *Sclerotinia species*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 890-896, 1979.

MARCIANO, P.; DI LENNA, P.; MAGRO, P. Oxalic acid, cell wall-degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isoletes on sunflower. **Physiological Plant Pathology**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 339-345, 1983.

McKINNEY, H. H. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 26, n. 5, p. 195-218, 1923.

MIKLAS, P. N.; PORTER, L. D.; KELLY, J. D.; MYERS, J.R. Characterization of white mold disease avoidance in common bean. **European Journal of Plant Pathology**, Heidelberg, v. 135, p. 525-543, 2013.

OLIVEIRA, R. R.; BRAZ, G. B. P.; OLIVEIRA JR., R. S.; HENTGES, M.; TAKANO, H. K.; VIDA, J. B. First Report of Sclerotinia Blight Caused by *Sclerotinia sclerotiorum* on *Crotalaria spectabilis* in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 99, n. 7, p. 1037. 2015.

PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 875-880, 1979.

REIMONTE, G.; CASTAÑO, F. Susceptibility of sunflower hybrids (*Helianthus annuus*) to mid stem rot and broken stem caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Ciencia e Investigación Agraria**, Santiago, v. 35, n. 1, p. 27-35, 2008.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 123-130. 2003.

SAHARAN, G. S.; MEHTA, N. **Sclerotinia Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management**. LXII. Ed. Heidelberg: Springer-Verlag GmbH, 2008. 486 p.

SAVARY, S.; FICKE, A.; AUBERTOT, J-N.; HOLLIER, C. Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. **Food Security**, Rotterdam, v. 8, n. 2. 2012.

SINGH, S. P.; TERÁN, H. Evolution of screening methods for detection physiological resistance to white mold in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**. East Lansing, v. 49, p. 40-41, 2008.

SILVA, M.; SILVA, R.; CONTE, B.; LERMEN, N.; CORONEL, D. FILHO, R. Análise da competitividade das exportações gaúchas para a China (1999-2013). **Ciências Sociais em Perspectiva**, Cascavel, v. 14, n. 27, p. 20-39, 2015.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. SAS user's guide: statistics. 5. ed. Cary: SAS Institute, 1985. 956 p.

TOWNSEND, B. B.; WILLETTS, H. J. The development of sclerotia in certain fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, Londres, v. 37, n. 3, p. 213-221, 1954.

TURKINGTON, T. K.; MORRALL, R. A. A. Use of petal infestation to forecast Sclerotinia stem rot of canola: the influence of inoculum variation over the flowering period and canopy density. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 682-689. 1993.

VENTUROSOSO, L. dos R. **Implicações da inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* em culturas bioenergéticas**. 2012. 58 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS.



VUONG , T. D.; HOFFMAN, D. D.; DIERS, B. W.; MILLER, J. F.; STEADMAN, J. R.; HARTMAN, G. L. Evaluation of soybean, dry bean, and sunflower for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Crop Science**, Madison, v. 44, n. 3, p. 777-783, 2004.

WILLETS, H. J.; WONG, J. A. L. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. **Botanical Review**, Cambridge, v. 46, p. 10-165, 1980.

YOUNG, A, C. S.; WERNER, C. P. Infection routes for *Sclerotinia sclerotiorum* in apetalous and fully petalled winter oilseed rape. **Plant Pathology**, Loughborough, v. 61, p. 730–738, 2012.

## CAPÍTULO II

### EFICIÊNCIA DE DIFERENTES ESPÉCIES DE CROTALÁRIA NO CONTROLE DE *Meloidogyne javanica*

#### **RESUMO:**

O uso da crotalárias na rotação de culturas aumenta a adição de matéria orgânica do solo que pode estimular o desenvolvimento de uma microflora antagônica que propicia o controle biológico dos nematóides, além de produzir alcaloides pirrolizidínicos como as monocrotalina, trichodesmine, grantianine, dicrotaline e etc., que apresentam alta toxicidade para os nematoides. Com isso o objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência de diversas espécies de crotalária no controle de nematoide *Meloidogyne javanica*, para o qual foram instalados três experimentos, o primeiro, segundo e o terceiro ensaio experimental foram conduzidos em vasos polietileno, contendo 2,0 dm<sup>3</sup> de substrato autoclavado, O quarto ensaio experimental foi realizado em tubetes de 120 cm<sup>3</sup>. O primeiro ensaio foi disposta em delineamento experimental de blocos ao acaso com 10 tratamentos e 4 repetições, o segundo experimento com o delineamento experimental de blocos ao acaso com 10 tratamentos e 6 repetições. Neste experimento, foi demonstrada baixa reprodução para *Meloidogyne javanica* em todas as espécies de crotalárias apresentando FR menor que 1 e apenas a *C. ochroleuca* obteve valores superiores significativamente comparados com as demais espécies. Nas avaliações das raízes observaram que todas as espécies de crotalária foram penetradas pelo nematoide. O número de J2 observados em *C. grahamiana* foram superiores que nas demais espécies, no entanto a espécie apresentou maior massa de raiz entre as crotalárias e também apresentou baixo número de fêmeas. *Crotalaria incana* não foram observadas fêmeas no interior das raízes diferentemente da *C. ochroleuca* que apresentou o maior número de fêmeas entre as crotalárias. Apenas as *C. juncea*, *C. ochroleuca* e *C. pallida* tiveram índice de fêmeas acima de 10%. Conclui-se que todas as espécies de crotalária apresentaram resistência ao de *Meloidogyne javanica*.

**Palavra-chave:** *Crotalaria anagyroides*, *C. breviflora*, *C. grahamiana*, *C. juncea*, *C. ochroleuca*, *C. paulina*, *C. incana*, *C. spectabilis*, *C. pallida*, *C. lanceolata*

EFFICIENCY OF DIFFERENT RATTLEBOX SPECIES IN THE CONTROL OF  
*Meloidogyne javanica*

**ABSTRACT:**

The rattlebox in the crops rotation system of increases the addition of soil organic matter that can stimulate the development of an antagonistic microflora that favors the biological control of nematodes, besides producing pyrrolizidine alkaloids such as monocrotalina, trichodesmine, grantianine, dicrotaline and etc. With high toxicity to nematodes. The objective of this work was to evaluate the efficiency of several species of crotalaria in the control of nematode *Meloidogyne javanica*, for which three experiments were installed, the first, second and third experimental trials were conducted in pots polyethylene, containing 2.0 dm<sup>3</sup> of autoclaved substrate. The fourth experimental test was performed in 120 cm<sup>3</sup> tubes. The first experimental was arranged in a randomized block design with 10 treatments and 4 replicates; The second experimental design of randomized blocks with 10 treatments and 6 replicates. In this experiment, low reproduction was demonstrated for *M. javanica* in all species of rattlebox showing RF less than 1 and only *C. ochroleuca* obtained higher values significantly compared with the other species. In the evaluations of the roots observed that all species of rattlebox were penetrated by the nematode. The number of J2 observed in *C. grahamiana* were higher than in the other species, however, the species had a higher root mass among the rattlebox and also presented a low number of females. *Crotalaria incana* no females were observed inside the roots differently from *C. ochroleuca* that presented the largest number of females among the rattlebox. Only *C. juncea*, *C. ochroleuca* and *C. pallida* had an index of females above 10%. It is concluded that all species of rattlebox presented resistance to that of *M. javanica*.

**Keywords:** *Crotalaria anagyroides*, *C. breviflora*, *C. grahamiana*, *C. juncea*, *C. ochroleuca*, *C. paulina*, *C. incana*, *C. spectabilis*, *C. pallida*, *C. lanceolata* and Root-knot nematode

## INTRODUÇÃO

*Crotalaria* L. pertence à tribo Crotalarieae (Benth.) Hutch., sendo o único gênero da tribo com representantes nativos no Brasil. O gênero é um dos maiores da família da Leguminosae, com 600 espécies nos trópicos e subtropicais do mundo (GARCIA et al., 2013; DEVECCHI et al., 2014). A crotalária é uma leguminosa caracteristicamente considerada cultura de cobertura, possuindo um crescimento vigoroso fornecendo uma boa cobertura no solo, fixando nitrogênio. No entanto a crotalaria, é comumente utilizada em áreas infestadas com nematóides.

Os fitonematóides são pragas agressivas, que afeta o sistema radicular, podendo causar a morte da planta, ou causar danos irreparáveis e enormes dificuldades para controle quando está estabelecido na área. Existem inúmeros nematóides que atacam as plantas em diversos patossistemas, destacam-se três tipos mais importantes na cultura da soja, os nematóides de galhas *Meloidogyne* spp; o nematoide de cisto da soja *Heterodera glycines*, e o nematoide das lesões radiculares, *Pratylenchus brachyurus*.

Um dos manejos deste patógeno é o uso de espécies não hospedeiras, antagonicas ou nematicidas, como as crotalárias. A crotalária, reduz as populações de nematóides de plantas parasitas por atuar como não hospedeiro ou hospedeiro pobre (RODRÍGUEZ-KÁBANA et al., 1989, 1992), além de produzir aleloquímicos tóxicos (HAROON e SMART, 1983, GOMMERS e BAKKER, 1988), proporcionando um nicho para flora e fauna antagonistas (LINFORD, 1937; LINFORD et al., 1938; KLOEPPER et al., 1991), e também o aprisionamento do nematóides na raiz (LAMONDIA et al., 1996).

Schwan 2003 e colaboradores estudando hospedabilidade de *Crotalaria* sp., *Crotalaria paulina*, *C. breviflora*, *C. retusa*, *C. ochroleuca*, *C. striata*, *C. anagiroides*, *C. spectabilis* e *C. juncea* a *Heterodera glycines* raça 10, identificaram que o nematóides penetrou nas raízes de todas as espécies, no entanto apenas nas espécies *C. retusa*, *C. ochroleuca* e *C. juncea*, os nematóides atingiram os estádios de juvenil de terceiro e quarto estádios, porém, não atingiram a maturidade.

De acordo com Wang (2002) a maioria dos nematóides parasitas de plantas suprimidos pela crotalária são nematóides endoparasitas sedentários. Como é o caso do controle de *Meloidogyne* spp através da *C. juncea* (GODFREY, 1928, GOOD, et al., 1965, MCSORLEY ET AL., 1994, TAYLOR, 1985), e sobre *Heterodera glycines* (RODRÍGUEZ-KÁBANA et al., 1992) e *Rotylenchulus reniformis* (ROBINSON et al.,

1998). No entanto há alguns nematóides migratórios que foram suprimidos por *Crotalaria* spp. como é o caso de *Belonolaimus longicaudatus* (REDDY et al., 1986), *Paratrichodorous minor*, *Xiphinema americanum* (GOOD ET AL., 1965, BRODIE ET AL., 1970) e *Radopholus similis* (BIRCHFIELD e BRISTLINE, 1956). Além deste fator, a resistência varia entre as espécies de crotalaria e o nematóides, por exemplo, *C. juncea* suportou a infecção moderada por *M. javanica*, enquanto *C. intermedia* apresentou maior resistência, e *C. paulina* e *C. spectabilis* mostraram alta resistência (SILVA et al., 1989).

McSorley (2002), sugeriu que essa variação pode ser devida à variação genética dentro das espécies de nematóides, cultivares, época de cultivo, história de campo, sistema de cultivo de cobertura, práticas concorrentes de campo ou fatores edáficos incluindo vários componentes biológicos associados à rizosfera da *Crotalaria* ou alteração do solo.

Tendo em vista estas informações apresentada pelos autores, o objetivo do trabalho é avaliar a eficiência de diversas espécies de crotalaria no controle de nematoide *Meloidogyne javanica*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia (LMAF) e em Casa de Vegetação na Faculdade de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Grandes Dourados, no período de outubro de 2014 a janeiro de 2017.

Foram instalados quatro experimentos sendo que o primeiro, segundo e o terceiro ensaios foram conduzidos em casa-de-vegetação, utilizando-se vasos polietileno contendo 2,0 dm<sup>3</sup> de substrato contendo solo (Latosolo Vermelho Distroférico) + areia + substrato PlantMax Hortaliças<sup>®</sup> (casca de pinus, turfa, calcário, superfosfato simples e nitrato de potássio) na proporção 1:1:1. O substrato foi autoclavado a 120 °C a 1 atm por 60 minutos com ciclo de três dias consecutivos. Posteriormente ao preparo do substrato, foi realizada análise química para proceder à correção com calcário dolomítico visando saturação de base de 60% e adubação do substrato. O quarto ensaio experimental foi realizado em tubetes de 120 cm<sup>3</sup>, e com o mesmo substrato dos ensaios anteriores e instalados em sala climatizada.

O primeiro e segundo ensaios foram implantados no dia 27/01/2014, ambos com os mesmos tratamentos. Utilizou-se o delineamento experimental de blocos ao acaso nos dois ensaios, no entanto o primeiro constitui-se de, dez tratamentos e quatro repetições e o segundo ensaio, com dez tratamentos e seis repetições. A unidade experimental para ambos os ensaios constituiu-se de um vaso contendo uma planta.

Os tratamentos foram constituídos de oito espécies de espécies de crotalária (*Crotalaria anagyroides*, *C. breviflora*, *C. grahamiana*, *C. incana*, *C. juncea*, *C. ochroleura*, *C. paulina*, *C. spectabilis*), duas testemunhas, Soja BMX Magna RR (Don Mario 7.0i) e o tomateiro cv. Santa Cruz.

Mudas das espécies de plantas em estudo foram preparadas em bandejas de poliestireno de 128 células. A semeadura foi realizada em duas etapas espaçadas no tempo para minimizar o efeito dos diferentes ciclos das espécies. As espécies *Crotalaria anagyroides*, *C. breviflora*, *C. grahamiana*, *C. incana*, *C. ochroleura*, *C. paulina* e *C. spectabilis* e o tomateiro cv. Santa Cruz, foram semeadas no dia 27/01/2014 e a Soja BMX Magna RR (Don Mario 7.0i) juntamente com a *C. juncea*, foram semeadas no dia 31/01/2014. O transplante foi realizado no dia 10/02/2014. A irrigação foi efetuada, mantendo-se um turno de rega diário, de modo a obter umidade média do solo em 60% da capacidade de campo.

A inoculação do experimento foi realizada sete dias após o transplante, com uma suspensão contendo 5000 ovos de *M. javanica* por unidade experimental, contidos em um volume de 10 mL de água, distribuída em três orifícios com dois centímetros de profundidade, equidistantes do colo da planta em um centímetro.

O inóculo inicial foi obtido de raízes de tomateiro do grupo Santa Cruz, mantido em condições de casa de vegetação. Para a extração, coletaram-se as raízes com galhas, sendo estas lavadas e cortadas em pequenos pedaços e trituradas em liquidificador em baixa rotação por 15 segundos, com solução de hipoclorito de sódio a 0,05%, e vertidas sobre uma peneira de 0,074 mm de abertura (200 mesh), acoplada a outra de 0,025 mm (500 mesh). A suspensão obtida foi passada em peneira de 500 mesh, lavada em água corrente para retirar o excesso de hipoclorito de sódio e foi vertida em um becker de vidro. Com auxílio de uma placa de “Peters” e um microscópio óptico, a suspensão de ovos foi quantificada e ajustada para 500 ovos por mL (HUSSEY e BARKER 1973; modificada por BONETI e FERRAZ 1981) (Figura 1).

Aos 60 dias após a inoculação, no primeiro ensaio, as raízes coletadas foram lavadas, pesadas (g) e em seguida foi realizada a extração de nematoides para quantificação de ovos (HUSSEY e BARKER, 1973; modificada por BONETI e FERRAZ, 1981), e o fator de reprodução (FR) calculado segundo Cook e Evans (1987). O FR foi obtido pela divisão da população final (Pf) nas raízes e no substrato e população inicial (Pi) dos nematoides. As reações das cultivares foram determinadas com base nos critérios propostos por Canto-Sáenz (1985) em que  $FR > 1$  indica suscetibilidade.

O segundo ensaio representou a sucessão de cultura e recuperação dos nematoides. Aos 60 dias após a inoculação, as plantas desbastadas, eliminando a parte aérea, e suas raízes foram picadas separadamente e incorporadas ao substrato, retornando assim para o mesmo vaso. Posteriormente, foram transplantadas mudas de tomateiro cv. Santa Cruz, com 15 dias de idade, para os vasos e cultivadas por um período de 60 dias, recebendo tratamentos culturais necessários. Ao término desse período, as partes aéreas das plantas foram eliminadas e foram coletadas as raízes e o solo separadamente, para que os mesmos passassem pelo processo de extração de nematoide (HUSSEY e BARKER, 1973; modificada por BONETI e FERRAZ 1981). Após a extração, quantificou-se o número de ovos por planta, número de juvenis de segundo estágio (J2) por planta, número de ovos no solo e número de J2 no solo. Calculou-se o

número de ovos por grama de raiz e número de J2 por grama de raiz, bem como o fator de reprodução (FR) (OOSTENBRINK, 1966; COOK e EVANS, 1987).

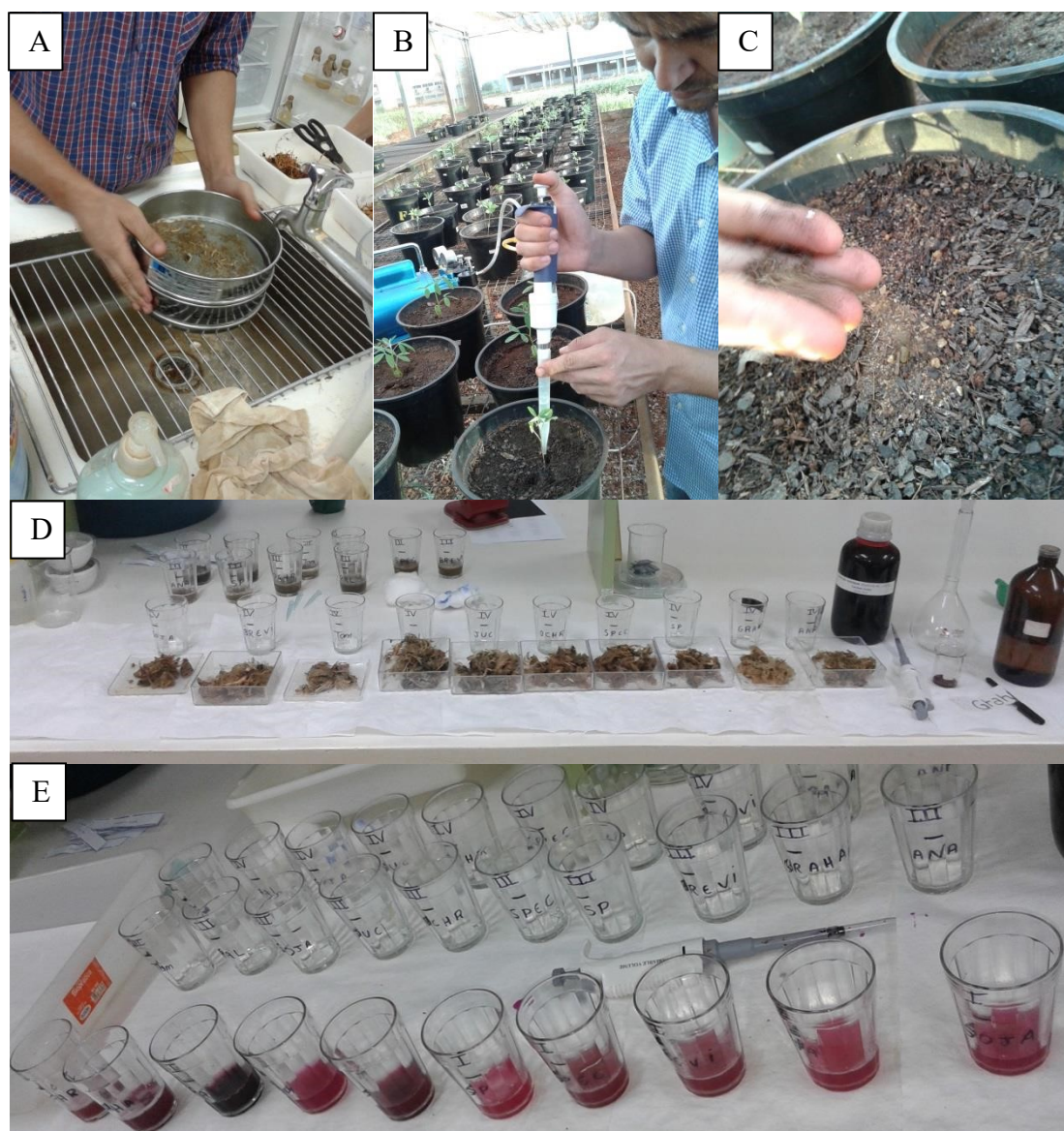


FIGURA 1 A. Preparo do inoculo de *Meloidogyne javanica*, B. C. inoculação dos tratamentos e acondicionamentos, D. raízes das espécies para extração, e. coloração dos ovos. Dourados, MS, 2017.

O terceiro ensaio difere do primeiro apenas por ter duas espécies a mais de crotalária (*C. lanceolata* e *C. pallida*) e do uso de uma cultivar de soja diferente, utilizando-se a cv. Monsoy 6410. Manteve-se o atraso de quatro dias, entre o primeiro e o segundo grupo de plantas a serem semeadas em bandejas. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com 12 tratamentos e quatro repetições, onde cada unidade experimental constituiu-se de um vaso com uma planta. Os tratamentos



foram constituídos por dez espécies de crotalária (*Crotalaria anagyroides*, *C. breviflora*, *C. grahamiana*, *C. incana*, *C. juncea*, *C. lanceolata*, *C. ochroleura*, *C. pallida*, *C. paulina* e *C. spectabilis*), duas testemunhas, Soja cv. Monsoy 6410 e tomateiro cv. Santa Cruz. Seguindo as mesmas indicações do primeiro ensaio, 60 dias após a inoculação, as raízes das plantas foram coletadas, lavadas, pesadas (g), e em seguida foi realizada a extração para quantificação de ovos e J2 (HUSSEY e BARKER, 1973; modificada por BONETTI E FERRAZ, 1981). Também o fator de reprodução (FR) foi calculado segundo Cook e Evans (1987).

O quarto ensaio foi realizado em sala de crescimento e incubação de plantas do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da Universidade Federal da Grande Dourados, em tubetes de 120 cm<sup>3</sup> dispostos em delineamento experimental em blocos casualizados com doze tratamentos e sete repetições, onde cada unidade experimental constituiu-se de um tubete com apenas uma planta. Os tratamentos foram constituídos de dez espécies de crotalária (*Crotalaria anagyroides*, *C. breviflora*, *C. grahamiana*, *C. incana*, *C. juncea*, *C. lanceolata*, *C. ochroleura*, *C. pallida*, *C. paulina* e *C. spectabilis*), duas testemunhas, tomateiro cv. Santa Cruz e soja cv. Monsoy 6410 RR IPRO.

A inoculação com a suspensão de ovos de nematoides foi realizada 24 horas após o transplante para os tubetes. Cada planta foi inoculada com 1500 ovos de nematoide. O experimento foi mantido por 45 dias à 25°C±3, com fotoperíodo de 12 horas. Após este período, as raízes foram coletadas, lavadas, pesadas para obtenção da sua massa fresca (g) e foram submetidas ao método de coloração de nematoide no interior do sistema radicular com hipoclorito de sódio e fucsina ácida (HUSSEY e DAYKIN, 1985). As raízes foram colocadas em um becker contendo 50 mL de água destilada e 10 mL de NaOCl 5,25% por um período de 4 minutos, agitando ocasionalmente as amostras. Em seguida, as amostras foram lavadas em água corrente por 15 segundos, e permaneceram em água por 15 minutos. Após este processo as amostras foram lavadas em água corrente e transferidas para frasco com 50 mL de água e 1 mL da solução estoque de fucsina ácida (solução estoque foi preparada, dissolvendo 3,5g de fucsina ácida em 250 mL de ácido acético e 750 mL de água destilada).

As amostras foram levadas ao micro-ondas e deixadas até levantar fervura. Após este processo, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente e lavadas em água corrente e em seguida as raízes foram colocadas em 30 mL glicerina acidificada

com duas gotas de NaOCl 5N e aquecida até à ebulição. As raízes foram armazenadas, em frasco, tipo coletor universal (HUSSEY e DAYKIN 1985).

Para avaliações, as raízes juntamente com a glicerina, foram dispersas em uma lâmina de vidro 70 x 200 mm sobreposta por outra lâmina e a leitura feita com auxílio de microscópio óptico. Quantificou-se o número de J2 e o número de fêmeas, calculou-se o Índice de fêmeas pela fórmula  $IF = (\text{número de fêmeas no material testado} / \text{número de fêmeas na soja suscetível}) \times 100$  (RIGGS e SCHMITT 1988)

Os dados foram submetidos à análise de variância com o auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2011), e as médias comparadas pelo teste de LSD Fisher, a 5% de probabilidade. Os dados de massa de raiz e o fator de reprodução e índice de fêmeas foram transformados em  $\sqrt{x + 1}$  e os dados de números de ovos e números de J2 foram transformados  $\log(x+1)$  na base 10.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos de massa fresca de raízes das espécies de crotalária indicam que houve diferença significativa, 5% de probabilidade pelo teste LSD Fisher, observando-se que as espécies *C. spectabilis*, *C. paulina*, *C. juncea*, *C. breviflora*, *C. grahamiana* e *C. ochroleuca* obtiveram os maiores valores para massa de raízes, variando de 62,66 a 98,48 gramas (Quadro 1). Estas espécies foram diferentes significativamente da *C. incana*, com apenas 24,69 g. A massa fresca de raiz do tomate, cultivar Santa Cruz, e Soja, BMX Magna RR (Don Mario 7.0i), foram 22,58 e 27,39, respectivamente.

*C. ochroleuca* obteve o maior fator de reprodução e números de ovos por grama de raízes, comparado com as demais espécies, exceto para ovos por grama que raízes onde *C. anagyroides* apresentou resultados semelhantes.

QUADRO 1. Massa de raízes, ovos por grama de raízes e fator de reprodução em diferentes espécies de crotalária no controle de *Meloidogyne javanica*. Dourados, MS, 2017.

Espécies	* Massa fresca de raízes	**Ovos/g Raízes	*Fator de Reprodução
<i>C. anagyroides</i>	36,83 bc	6,02 cd	0,04 a
<i>C. breviflora</i>	62,66 ab	0,81 ab	0,01 a
<i>C. grahamiana</i>	67,06 ab	2,20 ab	0,02 a
<i>C. incana</i>	24,69 c	3,84 bc	0,02 a
<i>C. juncea</i>	80,61 a	0,77 a	0,01 a
<i>C. ochroleuca</i>	62,89 ab	10,55 d	0,135 b
<i>C. paulina</i>	78,33 a	0,45 a	0,0075 a
<i>C. spectabilis</i>	98,48 a	1,08 ab	0,02 a
CV(%)	17,71	47,39	1,22

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste LSD Fisher 5% de probabilidade. \*Os dados foram transformados em  $\sqrt{x + 1}$ , \*\*Os dados foram transformados em log de  $x + 1$

O número de ovos por grama de raízes, obtido na extração do nematoide *M. javanica* aos 60 dias após a inoculação de tomate e o fator de reprodução calculado foram 6031 ovos por grama, com um fator de reprodução de 27,13, enquanto os valores para soja foi de 5730 ovos, com fator de reprodução de 28,2. Tomate e soja não foram diferentes entre si, entretanto quando comparado com as espécies de crotalárias estas demonstraram ser diferentes.

Neste experimento, constatou-se baixa reprodução de *M. javanica* em todas as espécies de crotalárias, apresentando FR menor que 1 entretanto a *C. ochroleuca* obteve valor superior, comparado com as demais espécies. No entanto, todas as espécies são resistentes de acordo com Oostenbrink (1966). Roberts (2002) apud Pereira et al. (2012) esclarece que a resistência de plantas ao nematoide das galhas, em geral, não protege a planta contra a penetração de juvenis, mas afeta o desenvolvimento ou a reprodução do nematoide em etapa posterior à penetração.

Nos resultados do segundo ensaio de inoculação de *M. javanica* (Quadro 2), referente sucessão de culturas, onde na primeira safra espécies de crotalárias e as testemunhas, e na segunda safra, tomate cultivar Santa Cruz, observou-se que o número de ovos recuperado de raízes de tomateiro em sucessão a *C. grahamiana* foi menor do que em tomateiro após *C. incana* e *C. juncea*, e não diferindo estatisticamente das demais. A média de ovos em raízes de tomateiro em sucessão à soja cultivar BMX Magna RR (Don Mario 7.0i) / tomate obteve 9294,23 ovos por grama de raízes. O número de ovos na sucessão tomate/tomate foi de 3331,99 ovos por grama. Este valor pode estar relacionado com a alta mortalidade das plantas ocasionada pela alta população de nematoide nas parcelas no dia do transplante. Não foi observado J2 em raízes de tomate da sucessão com *C. grahamiana*.

QUADRO 2. Massa fresca de raízes de tomateiro, número de ovos por grama de raízes e J2 por grama de raízes segundo ensaio do experimento de diferentes espécies de crotalária no controle de *Meloidogyne javanica*, em sucessão com tomate cultivar Santa Cruz. Dourados, MS, 2017.

Espécies	Massa fresca de raiz (g)*	Ovos/g Raiz**	J2/g**
<i>C. anagyroides</i>	1,90 ab	1,98 bc	1,10 ab
<i>C. breviflora</i>	2,12 a	1,61 abc	1,33 ab
<i>C. grahamiana</i>	1,66 ab	0,38 a	0,00 a
<i>C. incana</i>	2,08 ab	2,28 bc	2,08 b
<i>C. juncea</i>	0,81 b	2,63 c	1,22 ab
<i>C. ochroleuca</i>	1,85 ab	0,87 ab	0,73 ab
<i>C. paulina</i>	0,75 b	1,07 ab	0,42 a
<i>C. spectabilis</i>	0,98 ab	1,88 abc	0,83 ab
CV(%)	20,71	78,05	118,74

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste LSD Fisher 5% de probabilidade.

\*Os dados foram transformados em  $\sqrt{x + 1}$

\*\*Os dados transformados em  $\log$  de  $x + 1$  na base 10 e apresentados de acordo de com a fórmula.

Observaram-se também taxa de mortalidade de plantas em alguns tratamentos. O tratamento tomate na sucessão tomate (tomate/tomate) obteve 66% de taxa de mortalidade, enquanto que o tratamento soja/tomate 50% e 20% para *C. juncea*/tomate. A média da massa fresca das raízes dos tratamentos tomate/tomate que sobreviveram, foi de 0,57 gramas.

O solo advindo da sucessão *C. paulina*/tomate conteve o menor número de J2, com 1541,67 espécimes, diferente das demais espécies exceto para *C. ochroleuca*. Para o número ovos em solo de sucessão, apenas de tomates com *C. juncea* e *C. ochroleuca*, foram diferentes entre si (Quadro 3). Além do efeito da hospedabilidade aos nematóides, existem evidências que a incorporação ao solo da parte aérea de diferentes espécies vegetais pode reduzir a população de nematoides fitopatogênicos (LOPES et al., 2008).

QUADRO 3. Número de ovos e J2 extraído de solo experimental, no segundo ensaio do experimento de diferentes espécies de crotalaria no controle de *Meloidogyne javanica* em sucessão com tomate cultivar Santa Cruz. Dourados, MS, 2017.

Espécies	*Nº Ovos	*Nº J2
<i>C. anagyroides</i>	50,00 ab	3770,00 b
<i>C. brevipflora</i>	41,67 ab	2700,00 b
<i>C. grahamiana</i>	90,00 ab	3560,00 b
<i>C. incana</i>	62,50 ab	3662,50 b
<i>C. juncea</i>	20,00 a	3080,00 b
<i>C. ochroleuca</i>	120,00 b	2560,00 ab
<i>C. paulina</i>	58,33 ab	1541,67 a
<i>C. spectabilis</i>	41,67 ab	3191,67 b
CV(%)	93,26	5,79

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste LSD Fisher 5% de probabilidade. \*Os dados foram transformados em log de  $x + 1$  na base 10.

No terceiro ensaio os resultados de massa fresca de raiz foram distintos, comparado aos do primeiro ensaio. No entanto, os ensaios foram realizados em épocas distintas, considerando-se que espécies de crotalaria são sensíveis ao fotoperíodo (AMABILE et al., 2000; PEREIRA et al., 2005). Neste ensaio a *C. brevipflora* apresentou o menor valor comparado com as demais, com uma média de 9,86 gramas, seis vezes menor que no primeiro ensaio. *Crotalaria juncea* e *C. paulina* foram as

espécies que obtiveram os maiores valores e foram diferentes significativamente, a 5% de probabilidade pelo teste LSD Fisher (Quadro 4).

A avaliação da inoculação de ovos de *M. javanica* em tomate, cultivar Santa Cruz e soja, cultivar Monsoy 6410, obtiveram 8475 ovos por grama de raízes na extração de raízes de tomateiro com um fator de reprodução de 27,27, resultados foram similares ao primeiro ensaio, e a cultivar de soja Monsoy 6410 apresentou FR de 8,73.

QUADRO 4. Massa de raiz, J2 por grama de raiz, ovos por grama de raiz e fator de reprodução no terceiro ensaio de diferentes espécies de crotalária aos 60 dias da inoculação com *Meloidogyne javanica*. Dourados, MS, 2017.

Espécies	* Massa fresca de raiz	**J2/g Raiz	**Ovos/g Raiz	*Fator de Reprodução
<i>C. anagyroides</i>	11,59 de	37,29 c	45,16 b	0,11 a
<i>C. brevisflora</i>	9,86 e	15,74 bc	19,50 ab	0,04 a
<i>C. grahamiana</i>	15,10 cde	9,76 abc	17,21 a	0,06 a
<i>C. incana</i>	12,91 de	5,57 abc	20,52 ab	0,04 a
<i>C. juncea</i>	39,53 a	0,37 a	14,81 ab	0,10 a
<i>C. lanceolata</i>	11,68 de	1,93 ab	15,78 ab	0,04 a
<i>C. ochroleuca</i>	19,10 bcd	26,44 bc	19,58 ab	0,09 a
<i>C. pallida</i>	12,09 de	25,48 bc	26,08 ab	0,07 a
<i>C. paulina</i>	27,43 ab	5,45 abc	6,49 a	0,04 a
<i>C. spectabilis</i>	22,20 bc	3,57 abc	13,09 a	0,06 a
CV(%)	16,71	77,33	50,56	54,99

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste LSD Fisher 5% de probabilidade.

\*Os dados foram transformados em  $\sqrt{x + 1}$

\*\*Os dados foram transformados em log de  $x + 1$

Todas as espécies de crotalária apresentaram-se resistentes, de acordo com a classificação proposta por Taylor (1967). De acordo com os trabalhos desenvolvidos por pesquisadores demonstraram que há uma resistência variável entre as espécies de crotalária e os nematoides. Por exemplo, *C. juncea* suportou a infecção moderada por *M. javanica*, enquanto *C. intermedia* apresentou maior resistência, entretanto *C. paulina* e *C. spectabilis* mostraram alta resistência. (SILVA et al., 1989). Rosa et al. (2013) avaliando a reprodução de *Meloidogyne javanica* em olerícolas e em plantas utilizadas na adubação verde observaram que *C. juncea*, *C. spectabilis*, *C. brevisflora* comportaram-se como resistentes a *M. javanica*. Inomoto et al. (2006)

observaram que *C. spectabilis*, *C. breviflora* apresentaram-se como resistentes a *Meloidogyne javanica*.

No quarto experimento realizado, em que as raízes foram coloridas (Figura 2), observou-se que todas as espécies de crotalária foram penetradas pelo nematoide. O número de J2 observado em *C. grahamiana* foi superior, às demais espécies. No entanto, a espécie apresentou maior massa de raiz entre as crotalárias e também apresentou baixo número de fêmeas. Em *Crotalaria incana*, não foram observadas fêmeas no interior das raízes, diferentemente das demais e a *C. ochroleuca* foi a que apresentou o maior número de fêmeas entre as crotalárias (Quadro 5).

QUADRO 5. Massa de raiz, número de J2, número de fêmeas e índice de fêmeas em diferentes espécies de crotalária e tomateiro 45 dias após a inoculação de *Meloidogyne javanica*. Dourados, MS, 2017.

Espécies	Massa de Raiz	J2	Nº Fêmeas	IF%
<i>C. anagyroides</i>	0,09 c	4,00 a	1,29 abc	5,5 ab
<i>C. breviflora</i>	0,03 c	3,43 a	0,57 abc	2,4 ab
<i>C. grahamiana</i>	0,30 ab	18,29 b	1,29 abc	5,5 ab
<i>C. incana</i>	0,01 c	1,57 a	0,00 a	0,0 a
<i>C. juncea</i>	0,22 b	3,20 a	4,00 cd	14,1 bc
<i>C. lanceolata</i>	0,00 c	2,43 a	0,29 ab	1,2 a
<i>C. ochroleuca</i>	0,10 c	1,57 a	6,00 d	25,5 c
<i>C. pallida</i>	0,01 c	3,00 a	3,29 bcd	13,9 bc
<i>C. paulina</i>	0,05 c	2,86 a	0,71 abc	3,0 ab
<i>C. spectabilis</i>	0,22 b	2,14 a	0,29 ab	1,2 a
Tomate	0,40 a	25,14 b	23,57 e	100,0 d
CV (%)	4,36	47,99	39,66	52,71

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste LSD Fisher 5% de probabilidade. Os dados foram transformados em  $\sqrt{x + 1}$ .

*Crotalaria juncea* e *C. spectabilis* são as espécies frequentemente utilizadas no Brasil pela alta produtividade de material vegetal, facilidade de aquisição de sementes e multiplicação, além de apresentar alta resistência a *M. javanica*. Inomoto et al. (2008) avaliando em casa de vegetação algumas espécies vegetais e a crotalária no manejo de *M. javanica* obtiveram valores de fator de reprodução de 0,21 para *C. juncea* e 0,33 para *C. spectabilis* comprovando sua eficácia no controle do nematoide *M. javanica*. Rich e Rahi (1995) avaliando a influência de sementes moídas de *C. spectabilis* adicionado ao substrato no cultivo de tomateiro identificou que houve supressão no desenvolvimento de *M. incognita* e *M. javanica*. Borges et al. (2013),

avaliando a toxicidade de extrato aquoso de *C. juncea* sobre adultos de *Tubixaba tuxaua* e *Meloidogyne incognita* apresentam elevada eficiência no controle das duas espécies de fitonematoides.

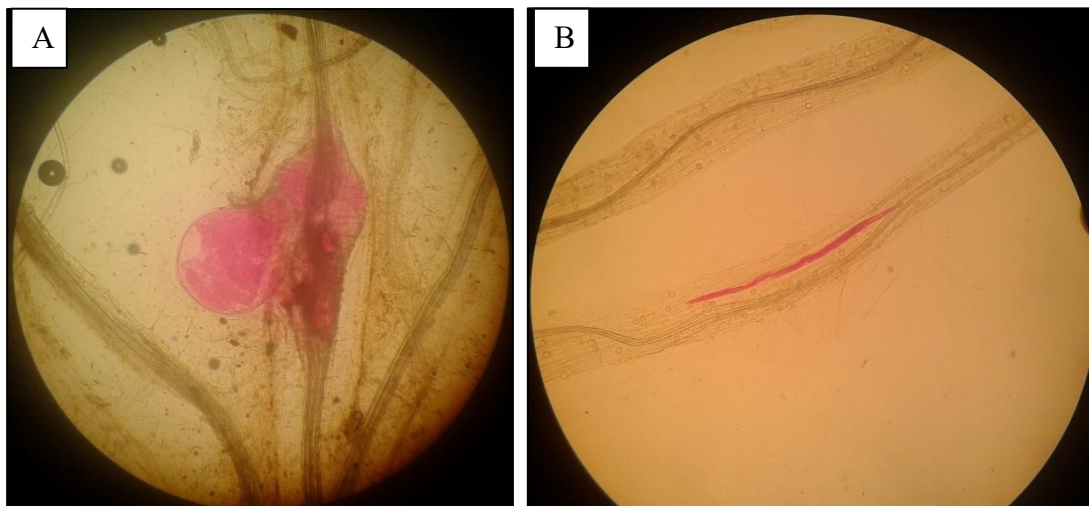


FIGURA 2 A. Fêmea de *Meloidogyne javanica* em raiz de tomate, B. J2 de *Meloidogyne javanica* em raiz de crotalária. Dourados, MS, 2017.

Segundo Wang et al. (2002), o modo da resistência da crotalária contra diferentes nematóides varia de acordo com as espécies de plantas e espécies de nematóides imbuído nos patossistemas. A resistência pode ser dividida em três partes: dificuldade na penetração do nematoide a raízes e morte precoce do nematoide no interior do hospedeiro, redução na reprodução dos nematoides e queda na produção de ovos dos nematoides e por fim inibição do crescimento ou desenvolvimento de nematoides.

No entanto os mecanismos da resistência das crotalárias a nematoides ainda não é totalmente conhecido, embora existam vários fatores que podem contribuir como as atividades alelopáticas através dos metabolitos secundários produzidos pelas plantas e por proteínas de defesa da planta como as enzimas lectinas, quitinases, fitormônios e proteínas relacionadas aos próprios patógenos (WANG et al., 2002; BURROWS et al., 1998; ANDRADE et al., 2010). Os fitormônios podem desempenhar vários papéis nas interações planta-nematoide, bloqueando a interação planta-nematoide e interferindo no reconhecimento da superfície radicular e na formação do local de alimentação do nematoide (CURTIS, 2007). Andrade et al. (2010), avaliando efeitos de uma nova proteína relacionada à patogênese Classe 10 (PR-10), (CpPRI) a partir de raízes de



*Crotalaria pallida* com atividade inibidora da papaína sobre nematoides das galhas *Meloidogyne incognita*, evidenciaram que esta proteína tem um papel na defesa da planta, exibindo atividade inibitória nos testes realizados.

O mecanismo de resistência das crotalárias aos nematóides das galhas tem sido parcialmente elucidada, levando em conta todas as informações descritas dos diversos mecanismos que envolvem a inibição do desenvolvimento de nematoides, tanto na ação nematicida dos compostos produzidos durante a fixação atuando na plasmólise celular, como na atividade da quitinase, resultando no processo é a liberação de N-acetilglucosamina, produção de aleloquímicos tóxicos CpPRI inibindo a papaína sobre nematoides das galhas (SANO et al., 1983; SANO, 1986). Danahap e Wonang (2016) estudando a eficácia de exsudados radiculares em algumas espécies de crotalária sobre o *M. incognita* em plantas de tomateiro, evidenciou a atividade nematicida apresentada pelas espécies *C. breviflora*, *C. juncea*, *C. retusa* e *C. spectabilis* sobre *M. incognita*, sugerindo que esta contém ingredientes biologicamente ativos que podem matar ou inibir desenvolvimento destes nematóides.

Wang et al. (2004) observaram que os resíduos de *Crotalaria juncea*, aplicados pouco antes do plantio, poderiam efetivamente reduzir as populações de *M. incognita* e galhas em raízes de abobrinha. No entanto, a alteração orgânica do solo não teve efeito em níveis mais elevados de populações de nematoides, e na verdade resultou num maior número de juvenis do que nos solos sem alterações.

Jourand et al. (2004b) analisando a atividade nematostática in vitro em juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. mayaguensis* por extratos aquosos de 15 espécies de crotalária, dividiu em quatro: 1º) os extratos de *C. glaucoides* não estavam ativos; 2º) os extratos radiculares de *C. goreensis*, *C. lathyroides* e *C. perrottetii* foram mais ativos que os extratos de caules; 3º) os extratos de caule de *C. comosa* e *C. cylindrocarpa* foram mais ativos que os extratos radiculares; 4º) tanto os extratos de ramos como os de raiz de *C. atrorubens*, *C. barkae*, *C. grantiana*, *C. hyssopifolia*, *C. pallida*, *C. podocarpa*, *C. retusa*, *C. senegalensis* e *C. sphaerocarpa* têm efeitos nematostáticos dependendo do crotalária ou tecido vegetal do qual os extratos foram derivados. A *Crotalaria barkae*, *C. grantiana*, *C. pallida* e *C. podocarpa* são as espécies de crotalaria mais eficientes, para todas as espécies de *Meloidogyne* avaliadas.

O uso dos alcalóides que são produzidos pelas crotalárias que são éster 1,2-dehidropirrolizidina (alcalóides pirrolizidínicos; PAs) têm o potencial de serem

utilizados no manejo de nematóide, principalmente nematóides endoparasitas sedentários (THODEN e BOPPRÉ, 2010). Extratos obtidos a partir de caules e raízes de *C. juncea* foram ativos contra juvenis de segundo estágio (J2). *Crotalaria juncea*, *C. spectabilis* e *C. saharae* apresentou atividade nematicida sobre juvenis de *Radopholus similis* e *Meloidogyne incognita* (SUBRAMANIYAN e SIVAGAMI, 1990).

Jourand et al. (2004a) avaliando extrato aquoso de folhas de *Crotalaria virgulata* subsp. *grantiana* sobre juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*, identificaram uma atividade nematostática numa proporção de 1 mg / mL (w/v) de extrato: a DL50 foi estimado para ser equivalente a 0,5 mg / ml.

Silva et al. (1989) observaram que *M. javanica* é menos atraído por raízes de *C. spectabilis* quando comparadas com tomateiro. Os autores também observaram que mesmo 45 dias após a inoculação de *Meloidogyne* spp. em raízes de *C. spectabilis*, *C. juncea*, *C. retusa* e *C. paulina*, não foi observado indivíduos na fase adulta. Silva et al. (1990), trabalhando com observações histopatológicas de raízes seccionadas de *C. spectabilis*, *C. juncea* e tomate, inoculadas com *M. javanica*, observaram que todas as plantas foram induzidas a produzirem células gigantes. No entanto, em plantas de crotalaria apresentava-se granular, com citoplasma denso, com menor número de núcleos e, frequentemente, a ausência de grandes vacúolos. O tamanho de cada célula gigante e o número de células gigantes por fêmea em crotalaria foi inferior ao observado em raízes de tomateiro. Em plantas resistentes de tomateiros, observou-se que os nematoides penetram nas raízes e migram em direção ao cilindro vascular, porém não ocorre a formação de células nutrizes. Entretanto, desenvolveu-se ao redor da região anterior dos juvenis de segundo estágio (J2) que penetraram uma região de células necróticas, também chamada de reação de hipersensibilidade (RH) (DROPKIN, 1969; HO et al., 1993 ).

Silva et al. (2013) avaliando as resposta de resistência em *Meloidogyne exigua*, em cafeeiro resistentes e suscetível, concluiu que a resistência da cultivar não é apenas devido à reação de hipersensibilidade pois ela apresenta um conjunto de respostas de defesa, que ambas são constitutivas e induzidas após a penetração do nematoide, inibindo a formação do local de alimentação ou a emigração.

O gênero *Crotalaria* se torna uma importante ferramenta para sistemas agrícolas sustentáveis, sua capacidade de aporte de nutriente principalmente de N fixado reflete no melhor crescimento das plantas além de ser uma alternativa para rotação para controle de nematoides, também possui tolerância a seca e é hospedeira de vários

insetos benéficos para o sistema (KIMENJU et al., 2008) dentre outros benefícios como proporcionar proteção da erosão do solo, redução da lixiviação de nutrientes, sequestro de carbono, supressão de plantas daninhas e manejo integrado de pragas e doenças. As culturas de cobertura protegem a qualidade da água ao reduzir as perdas de nutrientes, pesticidas e sedimentos. As culturas de cobertura aumentam a atividade de fungos micorrízicos promovendo uma relação simbiótica com as raízes das plantas para a absorção de água e nutrientes.

## CONCLUSÕES

*Meloidogyne javanica* penetrou em todas as raízes de todas as espécies de crotalária testadas

*Crotalaria anagyroides*, *C. breviflora*, *C. grahamiana*, *C. incana*, *C. juncea*, *C. lanceolata*, *C. ochroleura*, *C. pallida*, *C. paulina* e *C. spectabilis*, mostraram-se resistência a *Meloidogyne javanica*.

Mesmo que resistentes, as espécies tiveram resultados diferentes entre si. *C. ochroleuca* obteve o maior índice de fêmeas em suas raízes, e também obteve o maior fator de reprodução no primeiro experimento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMABILE, R. F.; FANCELLI, A. L.; CARVALHO, A. M. Comportamento de espécies de adubos verdes em diferentes épocas de semeadura e espaçamentos na região dos cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 47-54, 2000.
- ANDRADE, L. B.,S., OLIVEIRA, A. S., RIBEIRO, J. K. C., KIYOTA, S. VASCONCELOS, I., OLIVEIRA, J. T. A., SALES, M. P. Effects of a novel pathogenesis-related class 10 (pr-10) protein from *Crotalaria pallida* roots with papain inhibitory activity against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **The Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, p. 4145 - 4152, 2010.
- BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 553, 1981.
- BORGES, F. G.; KUHN, O. J., BATTISTUS, A. G., ESTEVEZ, R L., COLTRO, S. Toxicidade de tratamentos alternativos e químicos in vitro sobre *Tubixaba tuxaua* e *Meloidogyne incognita*. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 12, suplemento, dez., p. 440-449, 2013.
- BURROWS, P. R.; BARKER, A. D. P.; NEWELL, C. A.; HAMILTON, W. D. O. Plant-derived enzyme inhibitors and lectins for resistance against plant-parasitic nematodes in transgenic crops. **Pest Management Science**, Oxford, v. 52, n. 2, p. 176–183, 1998.
- CANTO-SAÉNZ, M. The nature of resistance to *Meloidogyne incognita*. In: SASSER, J. N.; CARTER, C. C. **An advanced treatise on Meloidogyne. Volume I. Biology and Control**. North Carolina State University/USAID. Raleigh. 1985. p. 225-231
- COOK, R.; EVANS, K. Resistance and tolerance. In: BROWN, R. H.; KERRY, B. R. (Ed.) **Principles and practice of nematode control in crops**. New York: Academic Press. 1987. p. 179-231.
- CURTIS, R. H .C. Do phytohormones influence nematode invasion and feeding site establishment?. **Nematology**, Reading, v. 9, n. 2, p. 155-160, 2007.
- DANAHAP, L.S., WONANG, D.L. Antinematicidal Efficacy Of Root Exudates Of Some *Crotalaria* Species On *Meloidogyne Incognita* (Root-Knot Nematode) (Kofoid And White) Chitwood Isolated From Infected *Lycopersicum Esculentum* L.(Tomato) Plant. **International Journal Of Scientific & Technology Research**, Nova Deli, v. 5, n. 03, 2016.
- DEVECCHI, M. F.; PIRANI, J. R.; MELO-DE-PINNA, G. F. A. Comparative leaf anatomy and morphology of some Brazilian species of *Crotalaria* L. (Leguminosae: Papilionoideae: Crotalariaeae). **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 28, n. 4, p. 583-593, 2014.

DROPKIN, V. H. The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 59, n. 11, p. 1632-1637, 1969.

FERREIRA, P. V. Análise de variância **In. Introdução à estatística experimental**. CECA-UFAL, 2011. p 105-117.

GARCIA, J. M. KAWAKITA, K.; MIOTTO, S. T. S.; SOUZA, M. C. O gênero *Crotalaria* L. (Leguminosae, Faboideae, Crotalarieae) na Planície de Inundação do Alto Rio Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 209-226, 2013.

GOMMERS, F. J e BAKKER, J. Physiological diseases induced by plant responses or products. In: POINAR JR, G. O.; JANSSON, E. H. B. eds. **Diseases of nematodes**, v. 1 Boca Raton, 1988. 322p.

GOOD, J. M.; MINTON, N. A.; JAWORSKI, C. A. Relative susceptibility of selected cover crops and Coastal Bermudagrass to plant nematodes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 55, p. 1026-1030, 1965.

HAROON, S.; SMART, JR. G. C. Effects of Pangola, Digitgrass on *Meloidogyne arenaria*, *M. javanica*, and *M. hapla* **Journal of Nematology**, Hanover, v. 15, n. 4, p. 649-650, 1983.

HO, J. Y.; WEIDE, R.; MA, H. M.; WORDRAGEN, M. F.; LAMBERT, K. N.; KOORNNEEF, M.; ZABEL, P.; WILLIAMSON, V. M. The root-knot nematode resistance gene (Mi) in tomato: construction of a molecular linkage map and identification of dominant cDNA markers in resistant genotypes. **Plant Journal**, London, v. 9, n. 4, p. 971-982, 1993.

HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v.57, p. 1025-1028, 1973.

INOMOTO, M. M.; ANTEDOMÊNICO, S. R.; SANTOS, V. P.; SILVA, R. A.; ALMEIDA, G. C. Avaliação em casa de vegetação do uso de sorgo, milho e crotalária no manejo de *Meloidogyne javanica*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, p. 125-129, 2008.

INOMOTO, M. M.; MOTTA, L. C. C.; BELUTI, D. B.; MACHADO, A. C. Z. Reação de seis adubos verdes a *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus brachyurus*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, DF, v. 30, n. 1, p. 39-44, 2006.

JOURAND, P.; RAPIOR, S.; FARGETTE, M.; MATEILLE, T. Nematostatic effects of a leaf extract from *Crotalaria virgulata* subsp. *grantiana* on *Meloidogyne incognita* and its use to protect tomato roots. **Nematology**, Reading, v. 6, n. 1, p. 79-84, 2004a.

JOURAND, P.; RAPIOR, S.; FARGETTE, M.; MATEILLE, T. Nematostatic activity of aqueous extracts of West African *Crotalaria* species. **Nematology**, Reading v. 6, p. 765-771, 2004b.

KIMENJU, J. W.; KAGUNDU, A. M.; NDERITU, J. H.; MAMBALA, F.; MUTUA, G. K. Y KARIUKI, G. M. Incorporation of green manure plants into bean cropping systems contribute to root-knot nematode suppression. **Asian Journal of Plant Sciences**, Lucknow, v. 7, n. 4, p. 404–408, 2008.

KLOEPPER, J. W.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; McINROY, J. A.; COLLINS, D. J. Analysis of populations and physiological characterization of microorganisms in rhizospheres of plants with antagonistic properties to phytopathogenic nematodes. **Plant and Soil**, Haia, v. 136, n. 1, p. 95-102, 1991.

LAMONDIA J. A. Trap crops and population management of *Globodera tabacum* tabacum . **Journal of Nematology**, Hanover, v. 28, p. 238–243, 1996.

LINFORD, M. B. Stimulated activity of natural enemies of nematodes. **Science**, Chicago, v. 85, n. 2196, p. 123-124, 1937.

LINFORD, M. B.; FRANCIS, Y.; OLIVEIRA, J. M. Reduction of soil populations of the root-knot nematode during decomposition of organic matter. **Soil Science**, Madison, v. 45, n. 2, p. 127-141, 1938.

LOPES, E. A.; FERRAZ, S.; FERREIRA, P. A.; FREITAS, L. G.; GARDIANO, C. G.; DHINGRA, O. D.; DALLEMOLE-GIARETTA, R. Efeito da incorporação da parte aérea de quatro espécies vegetais sobre *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 32, n.1, p. 76-80, 2008.

MCLEAN, E. K. The toxic actions of pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloids. **Pharmacological Reviews**, Maryland, v. 22, n. 4, p. 429-483, 1970.

OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematode and plants. **Mededelingen Landbouwhogeschool**. Wageningen, v. 66, n. 4, p. 46, 1966.

PADOVAN, M. P.; SAGRILO, E.; BORGES, E.L.; TAVARES, G.F. Acumulação de massa e nutrientes na parte aérea de adubos verdes num sistema sob transição agroecológica em Itaquiraí, MS. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta-RS, v. 3 – Suplemento especial, 2008.

PEREIRA, A. J.; GUERRA, J. G. M.; MOREIRA, V. F.; TEIXEIRA, M. G.; URQUIAGA, S.; POLIDORO, J. C.; ESPÍNDOLA, J. A. A. **Desempenho agrônomo de *Crotalaria juncea* em diferentes arranjos populacionais e épocas do ano**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. (Comunicado técnico, 82).

PEREIRA, T. B.; SALGADO, S. M. DE L.; CARVALHO, G. R.; PEREIRA, A. A.; FERREIRA, A. D.; OLIVEIRA, L. P. V. Reação de genótipos de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) A *Meloidogyne exigua* população sul de minas. **Coffee Science**, Lavras, v. 7, n. 1, p. 84-90, 2012.

PURSEGLOVE, J. W. **Tropical crops: Dicotylendons**. Longman Group Limited, London. 1974.

RICH, J. R.; RAHI, G. S. Suppression of *Meloidogyne javanica* and *M. incognita* on Tomato with Ground Seed of Castor, *Crotalaria*, Hairy Indigo, and Wheat. **Nematropica**, Lakeland, v. 25, n. 2, p. 159-164, 1995.

RIGGS, R. D.; SCHMITT, D. P. Complete Characterization of the Race Scheme for *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 20, n. 3, p. 39-395, 1988.

RODRÍGUEZ-KÁBANA, R., J. PINOCHET, D. G. ROBERTSON, and L. W. WELLS. Crop rotation studies with velvetbean (*Mucuna deeringiana*) for the management of *Meloidogyne* spp. **Supplement to Journal of Nematology**, Hanover, v. 24, p. 662-668, 1992.

RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; ROBERTSON, D. G.; WELLS, L.; KING, P. S.; WEAVER, C. F. Crops uncommon to Alabama for the management of *Meloidogyne arenaria* in peanut. **Supplement to Journal of Nematology**, Hanover, v. 21, p. 712-716, 1989.

ROSA, J. M. O.; WESTERICH, J. N.; WILCKEN, S. R. S. Reprodução de *Meloidogyne javanica* em olerícolas e em plantas utilizadas na adubação verde. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, n. 2, p. 133-141, 2013.

SANO, Z. I. Histological responses of three leguminous enemy plants to the penetration and development of *Meloidogyne incognita*. **Japanese Journal of Nematology**, Tsukuba, v. 16, p. 48-55, 1986.

SANO, Z. I., NAKASANO, K. C.; ARAKI, M. Penetration and development of *Meloidogyne incognita* in some enemy and host plants. **Proceedings of the Association for Plant Protection of Kyushu**, Fukuoka v. 29, p. 132-136, 1983.

SCHWAN, A. V. **Antagonismo de espécies de *Crotalaria* ao nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe)**. 2003. 59 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal Mato Grosso do Sul, Dourados-MS.

SEINHORST, J. W. The relationships between population increase and population density in plant parasitic nematodes. **Nematologica**, Wageningen v. 13, n. 3, p. 429 – 442, 1967.

SILVA, G. S.; FERRAZ, S.; SANTOS, J. M. Atração, penetração e desenvolvimento de larvas de *Meloidogyne javanica* em raízes de *Crotalaria* spp. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 13, p. 151-163, 1989.

SILVA, G. S.; FERRAZ, S.; SANTOS, J. M. Histopathology of *Crotalaria* roots infected with *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 1, p. 46-47, 1990.

SILVA, R. V.; OLIVEIRA, R. D. L.; FERREIRA, P. S.; FERREIRA, A. O.; RODRIGUES, F. A. Defense responses to *Meloidogyne exigua* in resistant coffee cultivar and non-host plant. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, n. 2, p. 114-121, 2013.

SUBRAMANIYAN, S.; SIVAGAMI, V. Effect of *Crotalaria spectabilis* on *Meloidogyne incognita*. **International Nematology Network Newsletter**, Raleigh v. 7, p. 8-9, 1990



TAYLOR A. L. **Introduction to research on plant nematology** In: FAO guide to study and control of the plant-parasitic nematodes. Rome: Food and Agricultural Organization of the United Nations, 1967, 133 p.

THODEN, T. C., BOPPRÉ, M. Plants producing pyrrolizidine alkaloids: sustainable tools for nematode management? **Nematology**, Reading, v. 12, n. 1, p. 1-24, 2010.

WANG K-H.; SIPES, B. S.; SCHMITT, D. P. *Crotalaria* as a cover crop for nematode management: a review. **Nematropica**, Lakeland, v. 32, n. 1, p. 35-58, 2002.

WANG, K.-H., MCSORLEY, R., MARSHALL, A.J., GALLAHER, R.N., Nematode community changes following decomposition of *Crotalaria juncea* amendment in litterbags. **Applied Soil Ecology**, Amesterdã, v. 27, p. 31 - 45, 2004.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de algumas espécies de crotalária na agricultura está cada vez mais frequente, principalmente nas grandes regiões produtoras de soja, milho e cana-de-açúcar. Crotalária é muito utilizada em rotação de culturas com a soja, apresenta grande potencial de uso como adubo verde e como cobertura morta, proporciona fixação de nitrogênio através de micro-organismo simbiote, controle de nematoides e reciclagem de nutrientes, entre outras. O uso de plantas antagônicas a nematoides na rotação de cultura vem se tornando uma prática vantajosa, pois possibilita a redução na população de fitopatógeno. A escolha da espécie de crotalária a ser utilizada na rotação é muito importante.

Todas as espécies estudadas foram resistentes a *Meloidogyne javanica* e dentro das populações de plantas observou diferenças dentro da própria espécie para a resistência a *Sclerotinia sclerotiorum*, necessitando assim de trabalhos com seleção para esta característica.

Assim pode-se destacar a utilização de *Crotalaria grahamiana* na rotação de cultura com a soja, no intuito de controlar nematoides em áreas com histórico de incidência de *S. sclerotiorum*, já que esta espécie apresenta resistência, no entanto ainda há necessidade de muitas pesquisas sobre espécies de crotalária que possam ser utilizadas nos sistemas de manejo e nas diferentes localidades do país. Ainda há necessidade de conduzir experimentos a campo em época do ano favorável à ocorrência do mofo branco e em área com a infestação natural pelo patógeno.

## ANEXO I

Descrição Botânica de algumas espécies de crotalária segundo Avendaño (2011):

***Crotalaria spectabilis***: Arbusto de 1-2 m de altura. Caules acanalados. Folhas simples. Lamina cartácea, ovalada, margem inteira. Inflorescência racemosa, terminal. Flores papilionadas. Pétalas cinco de coloração amarela. Estames 10 monadelfos. Tubo estaminal aberto na base, anteras dimorfas, cinco maiores e cinco menores. Ovário oblongo. Estilete curvo ou geniculado; estigma piloso. Legumes inflados, cilíndricos, oblongos, eretos ou pêndulos. Sementes pretas, lisas, brilhantes.



FIGURA 1 Diferentes espécies de crotalária utilizadas nos ensaios. **a.** *C. juncea*, **b.** *C. breviflora*, **c.** *C. incana*. **d.** *C. ochroleuca*, **e.** *C. spectabilis*, **f.** *C. paulina*. Dourados, MS, 2017

*Crotalaria juncea*: Arbusto, folhas simples; lamina linear elíptica, pubescentes, inflorescência racemosa, terminal flores papilionadas com cinco pétalas de coloração amarela, dez estames monadelfos, e tubo estaminal aberto na base, anteras dimorfas, cinco maiores e cinco menores, ovário oblongo. Possui estilete curvo ou geniculado; estigma piloso. Seus legumes inflados, cilíndricos, oblongos, eretos ou pêndulos. Sementes pretas, lisas, opacas. Sua floração é dependente do fotoperíodo. Ocorre em dias mais curtos, de abril até maio ou entre os meses de novembro e dezembro. Apresenta um crescimento inicial muito rápido, atingindo de 3,0 a 3,5 m de altura, em estação normal de crescimento. Esta espécie fixa em média  $150 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$  de N, tem uma relação C/N entre 17 e 19. Vários trabalhos demonstram o controle aos nematoides formadores de galhas (*Meloidogyne* sp.), *Rotylenchulus reniformis* e de cistos (*Heterodera glycini*), apresenta antagonismo a plantas infestantes como a tiririca (*Cyperus rotundus*) (DANAHAAP e WONANG, 2016; FONTANÉTTI et al., 2004; WANG et al., 2001; SCHWAN, 2003).

*Crotalaria ochroleuca*: Arbusto com 2,5 m de altura. Folhas simples pecioladas, lâmina trifoliada, pecioladas. Folíolos fortemente lanceolados. Flores papilionadas. Cinco pétalas de coloração amarela. Dez estames monadelfos. Tubo estaminal aberto na base, anteras dimorfas, cinco maiores e cinco menores. Ovário oblongo. Estilete curvo ou geniculado; estigma piloso. Legumes inflados, cilíndricos, oblongos, eretos ou pêndulos. Sementes marrons.

*Crotalaria breviflora*: Arbusto de porte baixo com folhas simples, elípticas. Flores papilionadas de cinco pétalas e coloração amarela. Dez estames monadelfos. Tubo estaminal aberto na base, anteras dimorfas, cinco maiores e cinco menores. Ovário oblongo. Estilete curvo ou geniculado; estigma piloso. Legumes inflados, cilíndricos, oblongos, eretos ou pêndulos. Sementes marrons.





FIGURA 2 Diferentes espécies de crotalária utilizadas nos ensaios. a. *C. anagyroides*, b. *C. grahamiana*, c. *C. lanceolata*. d. *C. pallida*. Dourados,MS, 2017

### Chave para identificação das espécies de *Crotalaria* L.

1. Ramos com alas internodais frequentemente presentes; folhas simples; cálice bilabiado; pétalas da carena com ápice torcido .....6. *C. vespertilio*
- 1'. Ramos com alas internodais ausentes; folhas digitado-trifolioladas; cálice 5-laciniado; pétalas da carena com ápice reto.
  2. Estípulas ausentes; folíolos lineares a lanceolados; lacínias menores que o tubo calicino ..... 2. *C. lanceolata*
  - 2'. Estípulas presentes; folíolos elípticos, largo-elípticos a obovados; lacínias maiores que o tubo calicino.
    3. Pecíolo frequentemente mais longo que o folíolo terminal; brácteas e bractéolas persistentes; lacínias do cálice livres ..... 1. *C. incana*
    - 3'. Pecíolo frequentemente mais curto que o folíolo terminal; brácteas e bractéolas caducas; lacínias do cálice com um ou dois pares conatos no ápice e as demais livres.

4. Flores até 1,2 cm compr.; bractéolas 0,1-0,2 cm compr.; estandarte ovado; legumes pêndulos, com ápice curvo  
 ..... 5. *C. pallida*

4'. Flores 1,5-1,8 cm compr.; bractéolas 0,2-0,5 cm compr.; estandarte cordiforme a reniforme; legumes eretos ou patentes, com ápice reto.

5. Folíolos até 1,2 cm larg.; flores distribuídas ao longo da ráquis; brácteas 0,2-0,25 cm compr., retilíneas; estandarte cordiforme  
 ..... 3. *C. maypurensis*

5'. Folíolos 1,5-2,4 cm larg.; flores agrupadas no ápice da ráquis; brácteas 0,5-0,8 cm compr., onduladas; estandarte reniforme  
 ..... 4. *C. micans*