

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**

**GERMINAÇÃO CARPOGÊNICA DE *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) DE BARY  
SOB DIFERENTES EXTRATOS E RESÍDUOS DE VEGETAIS**

**FRANCIMAR PEREZ MATHEUS DA SILVA**  
Engenheira Agrônoma

**DOURADOS  
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL  
2007**

**GERMINAÇÃO CARPOGÊNICA DE *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) DE BARY  
SOB DIFERENTES EXTRATOS E RESÍDUOS DE VEGETAIS**

**FRANCIMAR PEREZ MATHEUS DA SILVA**  
Engenheira Agrônoma

**Orientador: Prof. Dr. Walber Luiz Gavassoni**

**Dissertação 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 Mestre.**

**DOURADOS  
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL  
2007**

**GERMINAÇÃO CARPOGÊNICA DE *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) DE BARY  
SOB DIFERENTES EXTRATOS E RESÍDUOS DE VEGETAIS**

por

FRANCIMAR PEREZ MATHEUS DA SILVA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de **Mestre em Agronomia**.

Aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

---

Prof. Dr<sup>o</sup>. Walber Luiz Gavassoni  
Orientador - UFGD

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Lílian Maria Arruda Bacchi  
Co-Orientadora - UFGD

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Rodriguez Garcez  
Co-Orientadora – UFMS

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Kátia R. F. Schwan Estrada  
Membro externo - UEM

*A Deus,*

*Ofereço e Agradeço*

*Aos meus pais,  
Eduardo Matheus da Silva e Cleuza Perez da Silva pelo  
exemplo de dignidade e trabalho.  
dos quais me orgulho.  
e aos irmãos Lucivania, Lucimene, Juari  
Juarez e aos sobrinhos Wéliton, Raquel, Juliano e Eduardo  
**Dedico.***

## **AGRADECIMENTOS**

A **DEUS**, pela vida e oportunidades.

A Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado.

À FUNDECT/MS que cedeu recursos para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Professor Walber Luiz Gavassoni, pela orientação.

As Professoras Maria do Carmo Vieira, Fernanda Garcez e Lílian Maria Arruda Bacchi, pela contribuição.

A todos os professores, colegas do curso de Produção Vegetal e colegas de trabalho do Laboratório de Fitopatologia pelo apoio.

A todos meus amigos e de maneira especial ao querido amigo Roberto Baldo, pela companhia na rotina de estudos e trabalho e por toda a convivência.

As amigas Cinthia Raquel Mancin, Isabela Teixeira Etto, Kátiuske Correa Ferreira e Priscila Reginato, pela presença na rotina de trabalho e estudos, e por toda a convivência.

Enfim, a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

## **BIOGRAFIA**

Francimar Perez Matheus da Silva, filha de Eduardo Matheus da Silva e Cleuza Perez da Silva, nasceu em 18 de janeiro de 1982, em Angélica, MS.

Cursou Agronomia na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em Dourados, MS, sendo bolsista de iniciação científica em 2003 e 2004, desenvolvendo pesquisa na área de fitopatologia. Recebeu o diploma de graduação em abril de 2005.

Em março de 2005, ingressou no curso de mestrado em Agronomia (Área de concentração em Produção Vegetal), na Universidade Federal da Grande Dourados, na cidade de Dourados, MS, submetendo-se à defesa de dissertação em maio de 2007.

## SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE QUADROS.....	ix
RESUMO.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1 História taxonômica de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	03
2.2 Importância de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	04
2.3 Escleródio – Formação e germinação.....	05
2.3.1 Formação do escleródio.....	05
2.3.2 Germinação do escleródio.....	07
2.3.2.1 Germinação carpogênica.....	07
2.3.2.2 Fatores que afetam a germinação carpogênica.....	08
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Obtenção e manutenção de isolados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	15
3.2 Produção de escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> .....	15
3.3 Obtenção de extratos vegetais.....	16
3.4 Preparo dos resíduos vegetais.....	16
3.5 Extratos de resíduos vegetais.....	16
3.5.1 Extratos etanólicos de resíduos vegetais.....	16
3.5.2 Partição dos extratos etanólicos obtidos dos resíduos vegetais.....	17
3.6 Procedimentos padronizados.....	17
3.6.1 Desinfestação dos escleródios.....	17
3.6.2 Substrato ágar-água.....	18
3.6.3 Distribuição dos escleródios.....	18
3.6.4 Incubação.....	18
3.6.5 Delineamento experimental, avaliação e análise de dados.....	18
3.7 Avaliação do efeito dos extratos vegetais de plantas do cerrado sobre a germinação carpogênica de <i>S. sclerotiorum</i> .....	19
3.7.1 Extratos vegetais dissolvidos em dimetilsufóxido.....	19
3.7.2 Extratos vegetais dissolvidos em água.....	20
3.8 Efeito de concentrações de solventes.....	21
3.9 Avaliação do efeito de resíduos culturais de plantas cultivadas sobre a germinação carpogênica de <i>S. sclerotiorum</i> .....	21
3.9.1 Camada de resíduos de plantas cultivadas sobre os escleródios.....	21
3.9.2 Resíduos de plantas cultivadas incorporados ao ágar-água.....	22
3.9.3 Resíduos de plantas cultivadas desinfestados com tratamento térmico....	22
3.10 Avaliação do efeito de extratos de resíduos de plantas cultivadas sobre a germinação carpogênica de <i>S. sclerotiorum</i> .....	22
3.10.1 - Extratos etanólicos de resíduos de plantas cultivadas.....	22
3.10.2 – Fases obtidas da partição dos extratos etanólicos de resíduos de plantas cultivadas.....	23
3.11 Efeito de diferentes níveis de pH na germinação carpogênica.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1 Extratos vegetais de plantas do cerrado e germinação carpogênica.....	24
4.1.1 Avaliação do efeito dos extratos de plantas do cerrado dissolvidos em DMSO sobre a germinação carpogênica de <i>S. sclerotiorum</i> .....	24

4.1.2 Avaliação do efeito de extratos vegetais plantas do cerrado dissolvidos em água sobre a germinação carpogênica de <i>S. sclerotiorum</i> .....	24
4.2 Efeito de concentrações de solventes em ágar-água sobre germinação carpogênica de <i>S. sclerotiorum</i> .....	28
4.3 Resíduos culturais de plantas cultivadas e germinação carpogênica.....	32
4.3.1 Avaliação do efeito de camada de resíduos de plantas cultivadas sobre os escleródios e sobre sua germinação carpogênica.....	32
4.3.2 Avaliação do efeito de resíduos de plantas cultivadas incorporados ao ágar-água sobre germinação carpogênica de <i>S. sclerotiorum</i> .....	37
4.3.3 Avaliação do efeito de resíduos de plantas cultivadas submetidos a tratamento térmico sobre germinação carpogênica de <i>S. sclerotiorum</i> .....	41
4.4 Extratos de resíduos de plantas cultivadas e germinação carpogênica.....	43
4.4.1 Avaliação do efeito de extratos etanólicos de plantas cultivadas sobre a germinação carpogênica de <i>S. sclerotiorum</i> .....	43
4.4.2 Avaliação do efeito de fases otidas da partição de extratos etanólicos de resíduos de plantas cultivadas sobre germinação carpogênica de <i>S. sclerotiorum</i> .....	45
4.5 Efeito de diferentes níveis de pH na germinação carpogênica.....	48
5 CONCLUSÕES.....	51
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52



## LISTA DE QUADROS

	PÁGINA
<b>Quadro 1</b> Classificação botânica e parte da planta da qual foi obtido o extrato etanólico e data de coleta. Dourados/2007.....	20
<b>Quadro 2</b> Classificação botânica e parte da planta da qual foi obtido o extrato bruto e data de coleta. Dourados/2007.....	21
<b>Quadro 3</b> Nome científico e nome comum das plantas da qual foram obtidos os extratos etanólicos e as fases correspondentes. Dourados/2007.....	23
<b>Quadro 4</b> Germinação carpogênica de escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> sob efeito de extratos plantas do cerrado dissolvidos em água, aos 50 e 65 e 75 dias após a instalação do ensaio (DAI). Dourados/2007.....	25
<b>Quadro 5</b> Número médio de apotécios formados por de escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> sob efeito de extratos plantas do cerrado dissolvidos em água, aos 50 e 65 e 75 DAI. Dourados/2007.....	26
<b>Quadro 6</b> Germinação carpogênica de escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> sob efeito de diferentes concentrações dos solventes dimetilsulfóxido (DMSO) e etanol em ágar-água aos 42 e 50 e 65 DAI. Dourados/2007.....	28
<b>Quadro 7</b> Número médio de apotécios formados por escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> sob efeito de diferentes concentrações de solventes em ágar-água aos 42 e 50 e 65 DAI. Dourados/2007.....	30
<b>Quadro 8</b> Germinação carpogênica de escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> sob efeito de diferentes resíduos de plantas cultivadas sobre os escleródios e camada de $\pm 4$ mm com remoção aos 50 DAI e posteriores avaliações aos 65 e 80 DAI. Dourados/2007.....	32
<b>Quadro 9</b> Número de apotécios por escleródio de <i>S. sclerotiorum</i> germinados carpogenicamente, sob efeito de diferentes resíduos de plantas cultivadas sobre os escleródios em camada de $\pm 4$ mm com remoção aos 50 DAI e posteriores avaliações aos 65 e 80 DAI. Dourados/2007..	36
<b>Quadro 10</b> Germinação carpogênica de escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> sob efeito de diferentes resíduos de cultura incorporados ao ágar-água aos 45 DAI e posteriores avaliações aos 57 e 69 DAI. Dourados/2007.....	38

<b>Quadro 11</b>	Número de apotécios por escleródio de <i>S. sclerotiorum</i> germinados carpogenicamente, sob efeito de diferentes resíduos de cultura incorporados ao ágar-água, aos 45 DAI e posteriores avaliações aos 57 e 69 DAI. Dourados/2007.....	40
<b>Quadro 12</b>	Germinação carpogênica de escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> sob efeito camada de diferentes resíduos de cultura submetidos a tratamentos térmicos para desinfestação, sobre os escleródios, aos 52 DAI e posteriores avaliações após remoção da camada de resíduos aos 59 e 67 DAI. Dourados/2007.....	43
<b>Quadro 13</b>	Número de apotécios por escleródio de <i>S. sclerotiorum</i> germinados carpogenicamente, sob efeito de diferentes extratos obtidos de resíduos de culturas aos 37 DAI e posteriores avaliações aos 52 e 67 DAI. Dourados/2007.....	44
<b>Quadro 14</b>	Germinação carpogênica de escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> sob efeito de diferentes extratos de resíduos de culturas, com diferentes tipos de partições (fases), aos 50 DAI e posteriores avaliações aos 57, 64, 73 e 81 DAI. Dourados/2007.....	46
<b>Quadro 15</b>	Germinação carpogênica de escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> sob efeito de sob efeito de extratos etanólicos de aveia, ervilhaca e milho com pH mensurados e diferentes níveis de pH, aos 49 DAI e posteriores avaliações aos 65, 71 e 81 DAI. Dourados/2007.....	49

## RESUMO

SILVA, Francimar, P. M., Universidade Federal da Grande Dourados, Fevereiro de 2007. Germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary sob efeito de diferentes extratos e resíduos de vegetais.

Palavras-Chave: Mofo branco, extratos e resíduos.

Estudou-se o efeito de extratos etanólicos de e resíduos de vegetais na germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Os extratos estudados foram obtidos de árvores do cerrado, e de resíduos de plantas cultivadas (milho, feijão, aveia, milho e ervilhaca). A partir destes resíduos foram obtidos extratos etanólicos os quais foram posteriormente submetidos à partição com diferentes solventes e avaliado o efeito das fases obtidas. Em relação aos efeitos dos extratos das árvores, houve efeito supressor na germinação carpogênica dos extratos etanólicos da periderme de *Terminalia fagifolia* das sementes de *Magonia pubescens*. Extratos etanólicos da periderme de *Tabebuia heptaphylla* e das fases hexânica e  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CHCl}_3$  obtidas da partição do extrato etanólico do cerne de *Terminalia fagifolia* tiveram efeito inibidor na germinação carpogênica. Os resíduos de aveia, feijão, ervilhaca e milho distribuídos sobre os escleródios suprimiram a germinação carpogênica. Os extratos etanólicos de aveia e ervilhaca suprimiram a germinação carpogênica, enquanto de trigo, feijão milho e milho apenas retardaram a germinação carpogênica. As fases obtidas da partição dos extratos etanólicos de resíduos de culturas, independente do solvente utilizado na partição, e do resíduo cultural do qual foi extraído, reduziram a germinação carpogênica. O pH dos extratos de aveia, ervilhaca e milho não tiveram influência no efeito supressor da germinação carpogênica. Níveis de pH inferiores a 5,0 estimularam germinação miceliogênica.

## 1 INTRODUÇÃO

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é o agente causal da podridão de esclerotínia ou mofo branco, tombamento e murcha em diversas plantas de importância econômica (Bolton *et al.* 2006). Segundo Boland e Hall (1994) 75 famílias, 278 gêneros, 408 espécies e 42 subespécies ou variedades de plantas foram relatadas como hospedeiras deste patógeno e dentre essas plantas, destacam-se o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (BIANCHINI *et al.* 2005), o girassol (*Helianthus annuus* L.) (LEITE, 2005), o algodão (*Gossypium* spp.) (CHARCHAR *et al.* 1999) e a soja (*Glycine max* L.) (ALMEIDA *et al.* 2005). O patógeno sobrevive longos períodos no solo e afeta principalmente as raízes e as hastes das plantas. As partes mais altas das plantas podem eventualmente ser atacadas (LUMSDEN, 1979).

Na cultura do feijoeiro, o mofo branco é uma doença prevalente, principalmente, nos cultivos do outono-inverno (CNPAP, 2004), assumindo maior importância nos últimos anos, devido à expansão de áreas cultivadas sob irrigação via pivô central, nos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Goiás (PARISI, 2004). A condição de alta umidade associada a temperaturas amenas, favorece o desenvolvimento do patógeno (VIEIRA *et al.* 2001), dificultando o controle do mofo branco (FERRAZ *et al.* 1999). Isto faz com que a doença se torne mais severa a cada ano, pelo aumento da densidade de inoculo do patógeno no solo (MENEZES, 1995).

Para o girassol *S. sclerotiorum* é considerado o patógeno mais importante em todas as regiões produtoras do mundo, causando podridão branca de capítulo e haste, murcha de esclerotínia e tombamento ou podridões radiculares (LEITE, 2005). A importância da doença causada por este patógeno é dependente das condições climáticas na época de semeadura, e das características genéticas dos cultivares. (LEITE, 1997). A podridão de capítulo foi um dos fatores limitantes para a expansão da cultura no Paraná, no início da década de 80. A doença reduziu a produtividade em 73% (LEITE *et al.* 2000). A podridão de capítulo resulta em maiores perdas pois tem reflexo direto na produção, pela redução no número de aquênios por capítulo, na massa de aquênios e ainda na concentração e qualidade do óleo extraído. Perdas indiretas ocorrem devido à contaminação de lotes de sementes escleródios, cuja remoção é dificultada na operação de limpeza (MASIVERIC e GULYA, 1992).

Na cultura da soja a podridão de esclerotínia é uma das doenças mais antigas e ainda provoca perdas significativas na Região Sul e nas regiões altas do Cerrado. Além da redução do rendimento, a doença é importante por ocorrer nas principais regiões produtoras de semente. A fase mais vulnerável vai do estágio da floração plena ao início da formação das vagens, podendo, o patógeno, infectar qualquer parte da planta (ALMEIDA *et al.* 2005).

Dentre as medidas de controle preventivas preconizadas para o mofo branco, destaca-se a adoção de um sistema de rotação de culturas com espécies não hospedeiras. O controle químico só é eficaz preventivamente e nem sempre viável economicamente (CANTERI *et al.* 1999).

O sistema de plantio direto é uma alternativa para produção agrícola na região central do Brasil e caracteriza-se pelo cultivo em terreno coberto por palha, ausência de preparo de solo e adoção de sistemas de rotação de culturas (HERNANI e SALTON, 1997). No entanto, os efeitos de resíduos culturais (palha) sobre a viabilidade de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos, como *S. sclerotiorum*, são pouco conhecidos. Resultados de pesquisas preliminares, desenvolvidas na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em Dourados (SIMM *et al.* 2001), apontaram para efeito inibitório de alguns resíduos vegetais sobre a germinação carpogênica de *S. sclerotiorum*.

Na literatura, há relatos de efeito de compostos produzidos por plantas superiores como estimulantes de germinação de esporos de fungos, assim como estudos de atividade de extratos de plantas, óleos essenciais e metabólitos secundários isolados contra fungos fitopatogênicos, incluindo *Sclerotium rolfsii* (CLARK, 1989) e *Sclerotinia sclerotiorum* (SCHURT *et al.* 2006, MELLO *et al.* 2005, FRENCH, 1992; MÜLLER-RIEBAU *et al.* 1995, ZAMBONELLI *et al.* 1996; CARTA *et al.* 1996; DAFERERA *et al.* 2000; PITAROKILI *et al.* 2002 e 2003 e CARPINELLA *et al.* 2003).

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito de diferentes extratos e resíduos de vegetais na germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 História taxonômica de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Sclerotiniaceae é uma família de fungos da ordem Helotiales, do filo Ascomycota e inclui espécies que produzem ascos inoperculados em apotécios estipitados de coloração marrom, formados a partir de um estroma esclerocial. O desenvolvimento de um estroma esclerocial com um agregado de hifas melanizadas é a característica comum à todos os membros da família Sclerotiniaceae (WHETZEL, 1945 citado por BOLTON *et al.* 2006).

Bolton *et al.* (2006), numa extensa revisão sobre a biologia e características moleculares de *S. sclerotiorum*. Em adição elaboraram uma relação dos critérios taxonômicos adotados desde a delimitação da família Sclerotiniaceae por Whetzel em 1945 da família Sclerotiniaceae, e de critérios adicionais como características de tecidos estéreis do apotécio e do escleródio, ontogenia esclerocial, histoquímica e ultraestrutura de escleródio, características bioquímicas e seqüência de genes rRNA.

Atualmente 33 gêneros são reconhecidos. A distribuição de espécies dentro do gênero tem sido revista várias vezes. O sistema de separação de espécies no gênero é baseado no tamanho do escleródio, na associação com hospedeiro, tamanho de ascos e ascósporos ou análises de RFLP mitocondrial nuclear. Universalmente, três espécies válidas permanecem em *Sclerotinia sensu stricto*: *S. minor* Jagger, *S. trifoliorum* Eriks, e *S. sclerotiorum* (Lib) de Bary (KOHN *et al.* 1988 citados por BOLTON *et al.* 2006).

*Sclerotinia sclerotiorum* foi descrita pela primeira vez em 1837 como *Peziza sclerotiorum*. Este binômio permaneceu até que transferência para *Sclerotinia* e renomeada *Sclerotinia libertiana* Fuckel (PURDY, 1979), sendo *Peziza sclerotiorum* Lib. e *S. sclerotii* Fuckel considerados como sinônimos (WAKEFIELD, 1924, citado por BOLTON *et al.* 2006). Wakefield, em 1924, mostrou que *S. libertiana* estava em desacordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica. A transferência de espécie para outro gênero deveria preservar o nome específico original. Em 1924 Wakefield incorretamente relatou que a combinação *S. sclerotiorum* fôra primeiramente utilizada por G. E Massee em 1895,

resultando na citação *S. sclerotiorum* (Lib) Masee. Purdy (1979) relata que De Bary usou o nome em 1884. Portanto, o nome adequado e autoridade para o fungo deve ser *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. (BOLTON *et al.* 2006).

## 2.2 Importância de *Sclerotinia sclerotiorum*

O fungo *S. sclerotiorum* é um patógeno cosmopolita e muito agressivo, podendo causar doenças em raízes, flores, vagens, sementes, hastes, madeira e frutos de diversas espécies. Segundo Boland e Hall (1994) mais de 400 espécies de plantas são relatadas como hospedeiras deste patógeno, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas.

A ocorrência da doença pode causar perdas significativas em culturas economicamente importantes, tais como soja, feijão, girassol, verduras e hortaliças, havendo relatos de perdas de 85% e até perdas totais em culturas de feijão, onde o patógeno causa a doença conhecida como mofo branco. Para a cultura da ervilha, representa grande perigo nas áreas de cultivo adensados e irrigados sob pivô central, provocando perdas de até 100% (STANGARLIN *et al.* 2005). Segundo Leite (2005), este fungo é considerado o patógeno mais importante para o girassol no mundo, e está distribuído em todas as regiões produtoras.

O controle do patógeno em diversas culturas tem sido difícil devido sua capacidade de formar estruturas de resistência, que garantem sua sobrevivência por vários anos. Os escleródios sobrevivem no solo por 6 a 8 anos (BIANCHINI *et al.* 2005). Os escleródios presentes no solo em condições favoráveis germinam e formam apotécios que produzem grande quantidade de ascósporos, que são a fonte primária de infecção. Os ascósporos são disseminados pelo vento ou chuva e aderem-se aos tecidos vegetais, onde germinam e iniciam o processo de infecção.

O processo de infecção se dá pela penetração na cutícula do hospedeiro e desenvolvimento inter e intracelular e após alguns dias, formação de densa massa branca com aspecto de algodão, logo se tornando pardacenta. Formam-se então os escleródios - estruturas de resistência medindo de 1 a 10 mm ou ainda maiores. Os tecidos vegetais infectados apresentam inicialmente manchas aquosas que evoluem para uma podridão mole.

Segundo Abawi e Grogan (1979), em condições de alta umidade relativa, um apotécio maduro pode produzir até  $2 \times 10^8$  ascósporos em algumas semanas, os quais são liberados em temperaturas de 3 a 22°C, com maior intensidade entre 19 e 20°C. Os ascósporos podem

ser levados pelo vento e infectar plantas a longas distâncias da fonte produtora. Temperaturas superiores a 25° C e umidade relativa abaixo de 35% são limitantes para a sobrevivência dos ascósporos.

A formação de estrutura de resistência, o alto potencial epidemiológico, a ampla diversidade de plantas hospedeiras desse patógeno, limitam práticas de controle, como a rotação de cultura e na maioria das situações não há disponibilidade de cultivares resistentes e o controle químico nem sempre é eficiente ou economicamente viável (FERRAZ *et al.* 2003).

## **2.3 Escleródio – Formação e germinação**

O desenvolvimento de doenças infecciosas é caracterizado pela ocorrência de uma série de eventos sucessivos e ordenados, que incluem sobrevivência, disseminação, infecção, colonização e reprodução do patógeno, sendo um processo cíclico designado de ciclo da relação patógeno-hospedeiro também chamado de ciclo da doença (AGRIOS, 2005). Naturalmente, o escleródio é formado durante a relação estabelecida entre a planta e o patógeno, na ocorrência da doença, sendo posteriormente o principal responsável pela sobrevivência, disseminação e reprodução do patógeno.

### **2.3.1 Formação do escleródio**

Muitos dos patógenos veiculados pelo solo desenvolveram uma estrutura especializada de resistência bastante eficiente para sobreviver a condições adversas de ambiente. Trata-se dos escleródios, agregados compactos de hifas somáticas formando massas, em geral, arredondadas e de cor preta (AMORIM, 1995), que representam 90% do ciclo de vida do patógeno (KORA *et al.* 2003) e podem germinar pela produção de micélios ou apotécios. (ABAWI E GROGAN, 1979).

O escleródio se forma por anastomose de um grande número de hifas em uma estrutura rígida e compacta, de formato variável (LEITE, 2005). No processo de formação três fases distintas foram caracterizadas por Townsend e Willetts (1954), citados por Bolton *et al.* (2006). A iniciação caracterizada pelo crescimento aleatório e agregação de hifas resultando



em uma massa compacta e branca. Posteriormente ocorre o desenvolvimento pelo crescimento das hifas, aumento da área de agregação e compactação do agregado. A última fase é a maturação pela delimitação de superfície do agregado, deposição de melanina nas células da camada superficial, formando uma camada protetora e a consolidação interna da massa micelial. Os estágios de formação são acompanhados por diferenciação morfológica e bioquímica. A iniciação e maturação são afetadas por numerosos fatores tais como fotoperíodo, temperatura, concentração de oxigênio, fatores mecânicos e nutrientes (HAREL *et al.* 2005). A medula é composta por carboidratos,  $\beta$ -glucanos primários e proteínas (LE TOURNEAU, 1979). A melanina, superfície externa do escleródio tem a função de proteção em condições ambientais adversas e ainda de proteção contra a degradação microbiológica. (BELL E WHEELER, 1986; HENSON *et al.* 1999 citados por BOLTON *et al.* 2006). O escleródio maduro é recoberto por uma superfície pigmentada e no interior encontra-se uma medula de tecido parcialmente embebida em uma matriz gelatinosa, que fornece os nutrientes para a germinação.

Fatores ambientais e nutricionais que influenciam a formação de escleródios (CHET e HENIS, 1975; LE TOURNEAU, 1979; WILLETTS e BULLOCK, 1992; WILLETTS e WONG, 1980 citados por BOLTON *et al.* 2006). Escleródios são produzidos após crescimento micelial, encontrados em ambientes com nutrientes limitados (CHRISTIAS e LOCKWOOD, 1973 citados por BOLTON *et al.* 2006). Em condições artificiais de produção, o pH do meio de cultura tem mostrado significativa influência no desenvolvimento de escleródios, em meio neutro ou alcalino, a formação de escleródios é inibida (ROLLINS e DICKMAN, 2001, citado por HAREL *et al.* 2005). O pH de maneira geral tem papel complexo no ciclo de vida do patógeno, pHs ácidos são necessários para crescimento, virulência e produção de escleródios. Há hipóteses de que mutantes de *S. sclerotiorum* incapazes de formar ácido oxálico, também são incapazes de formar escleródios *in vitro* e perdem sua capacidade fitopatogênica (DICKMAN e MITRA, 1992; GODOY *et al.* 1990 citados por BOLTON *et al.* 2006) e uma vez perdida essa capacidade ela não é recuperada, mesmo com o fornecimento de condições favoráveis de pH (ROLLINS e DICKMAN, 2001 citado por HAREL *et al.* 2005).

Os escleródios são pretos e irregulares, normalmente medindo de 2-15 x 2-30 mm, (BIANCHINI, *et al.* 2005); porém, o tamanho dos escleródios pode variar drasticamente, dependendo do hospedeiro. No girassol, por exemplo, um escleródio pode ocupar toda a área

do botão floral, formando uma camada de até 1 cm de espessura e exceder 35 cm no diâmetro, enquanto no feijão normalmente formam-se escleródios que variam de 2-10 milímetros no diâmetro. A consistência varia de acordo com o estágio de maturação (PHILIPS, 1987).

Os componentes químicos majoritários em escleródios de *S. sclerotiorum* foram identificados como ergosterol e peróxido de ergosterol, além de triglicerídeos e ácidos graxos. (Garcez *et al.*, 2005). Embora de ampla ocorrência na natureza, a obtenção dos constituintes esteroidais de *S. sclerotiorum* ainda não havia sido relatada na literatura.

### **2.3.2 Germinação do escleródio**

Os escleródios germinam miceliogenicamente pela emissão de micélio ou carpogenicamente, com a formação de apotécios (ABAWI e GROGAN, 1979). De maneira geral, para ambos os tipos de germinação, a infecção pode ocorrer pelos tecidos saudáveis através da entrada por aberturas naturais. A penetração, entretanto é dependente da presença de nutrientes exógenos e de um filme de água. Tecidos senescentes ou tecidos necrosados fornecem os nutrientes necessários para iniciar a germinação e infecção.

Na germinação miceliogênica, o escleródio produz massas hifas hialinas multicelulares, brancas ou marrons, capazes de penetrar diretamente pela cutícula do hospedeiro, enzimaticamente ou mecanicamente (KORA *et al.* 2003). Pode também ocorrer infecção pelo estômato, onde o ácido oxálico produzido pelo fungo durante a infecção é envolvido no desarranjo das células guardas estimulando a abertura do estômato e facilitando a entrada das hifas. A germinação miceliogênica pode resultar em infecções que são incapazes de causar doença em plantas localizadas a mais do que 2 cm da origem da infecção. Normalmente a germinação miceliogênica causa podridão basal de haste e tombamento, cuja infecções são iniciadas na superfície do solo (HUANG e KOKO, 1992 citados por DILLARD *et al.* 1995).

#### **2.3.2.1 Germinação carpogênica**

A germinação carpogênica, a mais comum, se dá pela emissão de estipes em número variável de 1 a 25 por escleródio, ramificadas ou não, com apotécios formados em sua extremidade (REIS, 1975). O apotécio desenvolve-se a partir de pequenos núcleos de hifas

localizados dentro do escleródio, inicialmente denominados primórdios e posteriormente estipes. Os primórdios são formados principalmente no córtex dos escleródios, porém alguns podem se desenvolver no interior da medula; depois de formados, crescem rapidamente e os estipes tornam-se visíveis através de uma saliência formada sobre a superfície do escleródio. Posteriormente, ocorre a ruptura da camada superficial de melanina com emissão dos estipes. Embora muitos primórdios sejam formados, apenas alguns formam apotécios (SAITO, 1973, citado por PHILLIPS, 1987).

Na parte superior do apotécio situa-se uma camada himenial com ascos e muitas paráfises, onde são formados os ascósporos em número de oito por asco, que são ejetados para o exterior dos apotécios, (MASIREVIC e GULYA 1992) sendo então disseminados pelo vento (REIS, 1975). Cada apotécio pode produzir até  $2 \times 10^8$  ascósporos, por períodos contínuos de até 10 dias.

Os ascos são cilíndricos, medindo de 7 a 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro por 112 a 156  $\mu\text{m}$  de comprimento. Os ascósporos são elipsóides, hialinos, com dimensões de 4-6 x 9-14  $\mu\text{m}$  (CARDOSO *et al.* 2005). Os ascósporos são providos de uma mucilagem que facilita a fixação no tecido vegetal. Eles dependendo das condições ambientais e necessitam entre 48 e 72 horas de umidade contínua para a ocorrência da infecção (LUMSDEN, 1979).

Ascósporos são responsáveis pelas infecções na parte aérea das plantas, especialmente em inflorescências (HUANG e KOKO, 1992 citados por DILLARD *et al.* 1995).

Muitos desses esporos podem infectar ou serem depositados no campo no qual foram produzidos; entretanto muitos podem ser levados a longas distâncias em correntes de ar. Alta umidade relativa e alta incidência de radiação ultravioleta são nocivas a sua sobrevivência.

*Sclerotinia sclerotiorum*, por se tratar de um fungo homotático, é considerado autofértil, uma vez que ascósporos provenientes de um único escleródio são capazes de formar novos escleródios e apotécios (PHILLIPS, 1987).

### **2.3.2.2 Fatores que afetam a germinação carpogênica**

Muitos fatores, exógenos e endógenos podem afetar a germinação carpogênica dos escleródios, por isso pesquisas têm sido conduzidas principalmente sobre a interação entre a produção de apotécios e fatores ambientais, incluindo clima e o sistema solo.

A luz, temperatura e umidade são consideradas os fatores mais importantes para a germinação carpogênica (SUN & YANG, 2000). Le Torneau (1979), inclui a maturação, que está associada a mudanças, ao nível celular e à mobilização e deposição de materiais de origem orgânica e inorgânica nos escleródios. Saito (1978), citado por Abawi e Grogan (1979), sugeriu o termo “maturação funcional” para indicar a série de mudanças necessárias para que os escleródios sejam capazes de produzir apotécios. Quando escleródios são incubados sob condições adequadas para a germinação carpogênica, esta pode ser retardada, período que pode variar de 13 a 208 dias (WILLETS e WONG, 1980 citados por PHILLIPS, 1987).

Para que a germinação carpogênica ocorra, os escleródios precisam de condições ambientais favoráveis, ter luz suficiente e temperatura adequada (PHILLIPS, 1987) entre outros fatores, caso contrário, só ocorre a germinação miceliogênica.

Diversas amplitudes de temperatura favoráveis à germinação carpogênica têm sido relatadas na literatura. De maneira geral, as temperaturas estão compreendidas entre 10 e 25°C, devido a essas variações, tem sido sugerido que a temperatura na qual os escleródios são formados pode afetar sua habilidade de produzir apotécios, ainda que haja diferenças no comportamento entre raças e estirpes do patógeno de diferentes regiões. É possível que raças e estirpes do patógeno que requerem temperaturas maiores para produzir apotécios tenham sido selecionadas naturalmente em regiões de clima quente. A temperatura também apresenta efeitos sobre a liberação dos ascósporos, os quais são liberados na faixa de temperatura de 4 a 32° C; porém, com temperatura de 32°C, a liberação só ocorre nas primeiras quatro horas. Apotécios mantidos por 24 horas a 32°C perderam a capacidade de liberar esporos mesmo quando retornaram à temperatura de 22°C (PHILLIPS, 1987).

O teor de umidade do solo é o principal fator que determina a germinação carpogênica e é por isso que não se observa produção de apotécios antes da cobertura do solo pelo fechamento da cultura. A doença está sempre associada a eventos de irrigação ou períodos chuvosos. É necessário água livre ou potencial osmótico de aproximadamente 0 KPa para que a formação de apotécios possa acontecer. Apotécios são produzidos apenas em solos saturados e preferencialmente em locais úmidos protegidos por folhagens ou resíduos de vegetais. Estresse osmótico, mesmo leve, inibe a germinação carpogênica (ABAWI e GROGAN, 1975 citados por PHILLIPS, 1987). Ferraz *et al.* (1999), estudando o efeito de alguns fatores ambientais sobre a germinação carpogênica relataram que em tratamentos sem

umidade, não foram observados apotécios no outono e o número de apotécios foi significativamente menor no inverno do que em outro tratamento.

Existem contradições a respeito do efeito da luz sobre a formação de apotécios (PHILLIPS, 1987). A maioria dos autores assume que a luz não tem efeito nos estágios iniciais da germinação carpopogênica em *S. sclerotiorum*; entretanto, alguns autores sugerem que a luz pode afetar a iniciação da germinação. Bedi (1958) citado por Phillips (1987), observou que a formação de apotécios foi acelerada após a exposição à luz ultravioleta por uma hora, antes da incubação. Le Torneau (1979) relatou a fotossensibilidade de alguns estipes, através do crescimento voltado para direção da fonte de luz. Sun e Yang (2000) estudaram o efeito da luminosidade sobre a germinação carpopogênica e concluíram que escleródios submetidos à alta intensidade luminosa desenvolveram apotécios em poucos dias, ao contrário, várias semanas foram necessárias para a germinação destes escleródios quando a intensidade luminosa foi baixa.

Outro fator que influencia a germinação dos escleródios é a presença ou não de fontes externas de nutrientes no ambiente. Carboidratos tais como glucose, manitol e sacarose podem inibir a germinação carpopogênica, mas não a miceliogênica. A germinação carpopogênica não é dependente de fontes exógenas de nutrientes (LE TORNEAU, 1979).

Em condições naturais, a germinação é afetada pela profundidade na qual o escleródio se encontra e dois fatores estão provavelmente envolvidos, a aeração e a umidade. Adequado suprimento de oxigênio é necessário para a formação de apotécios, nas camadas mais profundas do solo os níveis de oxigênio decrescem e conseqüentemente a germinação pode ser afetada negativamente (PHILLIPS, 1987).

Poucas informações são encontradas a respeito do efeito do pH sobre a germinação carpopogênica. Bedi (1963) citado por Phillips (1987), considera ótimo o pH situado entre 6 e 9,7, enquanto que Kruger (1976) citado por Phillips (1987), relatou que o número de apotécios formados aumentou em pHs alcalinos e ao contrário, foi reduzido em pHs abaixo de 5,5. Litkei e Voros (1984) relataram que o pH ótimo para a germinação de apotécios era até oito, enquanto que em menores níveis de pH, apenas micélio foi formado.

Vários compostos podem inibir a germinação, tais como íons metais divalentes, açúcares simples, soluções tampão e alguns fungicidas e herbicidas (PHILLIPS, 1987). Outros podem também estimular, mesmo alguns fungicidas, tais como vinclozolin e herbicidas como trifluralin, pendimethalin, metribuzin, simazine e atrazine (RADKE, 1986).

A supressão de *S. sclerotiorum* na cultura da soja, pelo tratamento com o herbicida lactofên foi detectada por Dann *et al.* (1999). Em locais cuja incidência da doença foi alta, sendo a severidade da doença reduzida 40 a 60% em comparação com o tratamento controle. Segundo o autor, é improvável que o efeito tenha sido sobre o fungo diretamente, uma vez que o herbicida é rapidamente degradado em ambientes aeróbicos, na planta tem pouca translocação e em 24 dias é metabolizado para compostos biologicamente inativos. O efeito deve-se provavelmente a uma resposta inicial similar à reação de hipersensibilidade, pois o herbicida inibe a enzima protox, envolvida na biossíntese de clorofila na rota fotossintética, resultando no acúmulo de gliocelinas no tecido da planta, efeito esse que teve associação com a redução da severidade da doença.

Compostos produzidos por plantas superiores também podem atuar como estimulantes de germinação de esporos de fungos. Há estudos mostrando a atividade de extratos de plantas, óleos essenciais e metabólitos secundários isolados contra fungos fitopatogênicos, incluindo entre outros patógenos, *S. sclerotiorum* (FRENCH, 1992; MÜLLER-RIEBAU *et al.* 1995, ZAMBONELLI *et al.* 1996; CARTA *et al.* 1996; DAFERERA *et al.* 2000; PITAROKILI *et al.* 2002 e 2003; CARPINELLA *et al.* 2003). A toxicidade apresentada pelos óleos essenciais sobre alguns microrganismos, pode ser devida à alta complexidade de sua composição química. A reunião de vários componentes na composição de óleos essenciais pode atuar em sinergismo e apresentar uma ampla gama de atuação fungicida ou fungistática. Trabalhos desenvolvidos com extrato bruto ou óleos essenciais, obtidos de plantas medicinais da flora nativa, têm indicado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta inibindo o crescimento micelial e a esporulação quanto pela indução de fitoalexinas (COOK e BAKER, 1983). Fitoalexinas são metabólitos secundários, antimicrobianos, de baixo peso molecular produzido pelas plantas em resposta a estresses físicos, químicos e biológicos, sendo capazes de impedir ou reduzir a atividade de agentes patogênicos (PURKAYASTHA, 1995).

Ferraz *et al.* (1999) demonstraram ser possível reduzir a emissão de apotécios com a cobertura do solo com material palhoso. Em sistema de plantio direto, o número de apotécios também foi reduzido quando foi mantida camada de palhada picada de milho e trigo (GRACIA-GARZA e BOLAND, 1998).

A utilização de palhada de gramíneas, como braquiárias, *B. brizantha* e *B. ruzisiensis*, arroz, trigo e aveia, com 3 cm a 5 cm de espessura sobre o solo, pode reduzir a germinação de

escleródios e conseqüente formação de apotécios, mesmo em solos ricos em matéria orgânica. A cobertura morta do solo, associada ao plantio direto, além de incrementar populações de microrganismos que atacam os escleródios no solo, serve de barreira física ao lançamento de esporos a partir dos apotécios (LOBO JUNIOR, 2005).

Em ensaios laboratoriais Simm *et al.* (2001) observaram maior produção de apotécios na testemunha ágar-água e no tratamento com cobertura de resíduos de milho como cobertura, após 50 dias de incubação. Neste mesmo trabalho foi observada inibição da germinação carpogênica por resíduos de aveia.

Melo *et al.* (2004), em ensaios laboratoriais, num estudo sobre o efeito de resíduos de culturas sobre a germinação carpogênica, encontraram maiores porcentagens de germinação carpogênica em escleródios cobertos com resíduos da cultura do milho, seguidos de escleródios cobertos com resíduos de aveia+ervilhaca peluda+nabo. Escleródios cobertos com restos culturais de um sistema envolvendo a cultura do trigo e outro com resíduos de nabo tiveram porcentagens de germinação inferiores. Em relação à formação de apotécios por escleródio, restos culturais de milho, de nabo e um sistema envolvendo aveia resultaram em número superior de apotécios em relação ao tratamento cobertura com solo.

Pesquisas sobre a atividade fungitóxica de extratos de vegetais na germinação carpogênica têm sido realizadas e resultados promissores têm sido relatados. Stefanello *et al.* (2006), estudando o efeito de extratos de árvores do cerrado encontrou efeito supressor na germinação carpogênica de extratos de *Tabebuia heptaphylla* e *Combretum laxum*. Gavassoni *et al.* (2006), investigando o efeito de extratos de plantas cultivadas, encontraram menor germinação de escleródios tratados com extratos à base de aveia, trigo, ervilhaca e feijão em relação aos tratados com extrato de milho e testemunha, que foram estatisticamente iguais. Kulczynski e Radonnski (2004), em ensaios no laboratório, estudaram a atividade fungitóxica de extratos aquosos e alcólicos de plantas medicinais e encontraram efeito do extrato aquoso de camomila sobre o desenvolvimento do fungo. Sharma e Basandrai (1997) obtiveram inibição de viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum* isolados de ervilha, grão de bico, couve-flor e rabanete, com extratos foliares crus de nim (*Azadirachta indica*), *Lantana camara* e *Cannabis sativa*, sendo o primeiro mais eficiente na redução da germinação. Chattopadhyay *et al.* (2002) controlou *S. sclerotiorum* com extrato de alho (1 %) em experimentos no laboratório.

Schwingel (2006) em ensaios laboratoriais encontrou efeito supressor na germinação carpogênica de escleródios cobertos com resíduos de *Brachiaria* sp. nos 50 dias iniciais da condução do ensaio e 57, 64 e 72 dias após a retirada dos resíduos de várias espécies avaliadas. *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés, *B. brizantha* cv. Marandu, *B. brizantha* cv. Liberdade, *B. ruziziensis*, *B. dictioneura* e *B. decumbens* reduziram significativamente a porcentagem de germinação dos escleródios, e dentre essas espécies *B. decumbens* suprimiu a germinação em 100% dos escleródios seguida de *B. dictioneura* e *B. brizantha* cv. La Liberdade com 84% e 72%, respectivamente.

Mello *et al.* (2005), em estudos com produtos alternativos para inibição de *S. sclerotiorum* detectou a inibição do crescimento micelial e na produção de escleródios nos tratamentos com composto orgânico comercial com concentração de 30% e Nim concentrado a 0,5%.

Alguns pesquisadores estudaram a produção de apotécios de escleródios de diferentes origens. Ferraz e Café Filho (1998) observaram que os escleródios provenientes do solo produziram maior número de apotécios, enquanto que os escleródios mais jovens formados *in vitro* e na planta tenderam a germinar carpogenicamente em maior número, mas com menor número de apotécios por escleródio. Os escleródios mais jovens incrementam a germinação carpogênica com o tempo, provavelmente devido a processos de maturação do escleródio e por estarem inicialmente livres de contaminantes.

O tipo de solo também pode influenciar na germinação carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum*. Costa e Costa (2006) estudaram a influência do solo e de substratos para produção de escleródios na germinação carpogênica e concluíram que o tipo de solo influencia na produção de apotécios, ainda que solo não cultivado apresente características supressivas evidenciadas pelo atraso na emissão estipes e formação mais lenta dos apotécios. Observaram também uma redução do número de estipes e apotécios, em relação ao solo cultivado.

Micoparasitas que sobrevivem no solo produzem metabólitos antifúngicos e exercem um grande papel no antagonismo entre microrganismos. Dentre os fungos que possuem informação genética para a produção de substâncias inibidoras, destacam-se os gêneros *Trichoderma* e *Penicillium*, porém, a produção de metabólitos por antagonistas no solo não é bem esclarecida, e baseia-se grandemente em suposições (LOBO JUNIOR e ABREU, 2000).



Entre os efeitos provocados pelas substâncias inibidoras, pode ser observada a redução ou paralisação do crescimento e esporulação, redução na germinação de esporos, além de distorções na hifa e endólise (Campbell, 1989 citado por Lobo Junior e Abreu, 2000). *Coniothyrium minitans* Campbell é um fungo necrotrófico com distribuição em todo o mundo e tem sido utilizado no controle de *S. sclerotiorum* em baixos níveis de doença. Este micoparasita tem a capacidade de parasitar os escleródios e reduzir a produção de apotécios, diminuindo o nível de doença. Seu crescimento ocorre lentamente através dos escleródios e na superfície deles são produzidos os picnídios (CASSIOLATO, 1998).

Quanto às práticas culturais como a rotação de cultura que é recomendada como medida para controle do mofo-branco, o uso de resíduos de braquiária tem-se apresentado como uma das principais ferramentas no controle desta doença pela redução do potencial de inóculo.

Costa (2003) estudando a influência da braquiária e do plantio direto no manejo de doenças do feijoeiro observou a presença de palhadas densas de sistema de plantio direto podem ser utilizadas como barreira física para a germinação dos apotécios, o que causa redução do inóculo e aumenta a eficiência de controle químico do mofo-branco.

Resultados obtidos por Costa (2003) indicaram que a densidade de inóculo no solo limita a eficiência de fungicidas no controle do mofo-branco, em solos contendo diferentes densidades de inóculo do fungo no solo, o controle adequado da doença só foi obtido nas áreas com menos de 19 escleródios por m<sup>2</sup> de solo, já naquelas com mais de 27 escleródios por m<sup>2</sup>, os fungicidas foram ineficientes no controle.

Ensaio posteriores conduzidos pelo mesmo pesquisador demonstraram que palhada de milho e *Brachiaria brizantha* foram eficientes em permitir a redução do potencial de inóculo aflorando à superfície do solo e conseqüentemente, permitiram a redução no número de pulverizações e assim maior eficiência no controle da doença foi alcançado.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção e manutenção de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*

Os isolados do fungo *S. sclerotiorum*, utilizados nos ensaios, foram obtidos em áreas naturalmente infestadas nos municípios de Naviraí, Itaporã e Ponta-Porã (Fazenda Agropastoril Jotabasso) e de áreas experimentais da Fazenda Experimental de Ciências Agrárias (FAECA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), doravante denominados respectivamente, isolados Naviraí, Itaporã, Jotabasso e NCA. Escleródios dos isolados foram removidos de plantas de feijão e girassol infectadas e armazenados em refrigerador a 5°C. Posteriormente, foram desinfestados superficialmente pela imersão por 1 minuto em solução de hipoclorito de sódio a 2% e plaqueados em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA). Após germinação miceliogênica, discos de micélio foram transferidos para tubos de ensaio contendo BDA inclinado. Após o crescimento micelial ter coberto toda a superfície do meio, os tubos foram lacrados e armazenados em refrigerador a 5°C para manutenção dos isolados.

Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da Faculdade de Ciências Agrárias da UFGD.

#### 3.2 Produção de escleródios de *S. sclerotiorum*

Para a produção de escleródios, discos miceliais de aproximadamente 2 mm foram repicados em placas de Petri contendo BDA. Posteriormente, foram vedadas com filme-plástico e incubadas. Uma semana depois, o patógeno foi repicado para erlenmeyers contendo uma camada de aproximadamente 20 mm de discos de cenoura previamente autoclavados a 120°C/1atm/20' e incubados à 25°C, sob escuro pleno por quatro semanas, para formação de escleródios. Após este período, os escleródios foram coletados utilizando-se peneira de 40 “mesh” (abertura de 0,42 mm) e lavados em água corrente. Os escleródios foram depositados em placas de Petri, forradas com papel absorvente esterilizado para remoção do excesso de umidade e postos a secar à temperatura ambiente. Secos, os escleródios foram identificados e armazenados à 5°C.

### **3.3 Obtenção de extratos vegetais**

A coleta das plantas e o preparo dos extratos foram feitos pela equipe do Laboratório de Pesquisa 1 (LP-1) do Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) em Campo Grande-MS, liderada pelos professores Walmir e Fernanda Garcez.

Foram coletadas plantas de famílias que têm sido estudadas pela equipe de pesquisa, particularmente de Meliaceae, Bignoniaceae, Rubiaceae, Lauraceae e Combretaceae, por se constituírem em grupos de plantas das quais têm sido obtidos compostos bioativos (Quadro 1).

De cada espécie coletada, foi preparada uma exsicata, feita a identificação botânica, sendo a exsicata depositada no Herbário da UFMS.

Os materiais vegetais coletados foram secos à sombra sob temperatura ambiente. Posteriormente, foram moídos em moinho elétrico, para obtenção de pó. Os extratos em etanol foram obtidos através da extração do pó de cada espécie vegetal (200g) em etanol a frio (percolação), por um período de cinco dias, após o qual foi filtrado em papel e o solvente evaporado sob baixa pressão.

### **3.4 Preparo dos resíduos vegetais**

Os resíduos culturais estudados (milho, feijão, aveia, trigo, ervilhaca e milho) foram coletados nas áreas experimentais da Fazenda Experimental da Faculdade de Ciências Agrárias (antigo Núcleo de Ciências Agrárias - NCA). Os resíduos culturais foram desidratados a 55°C 48 h em estufa com circulação de ar. Após a moagem em moinho elétrico, os resíduos foram mantidos em Freezer à -15°C até ser utilizado.

### **3.5 Extratos de resíduos vegetais**

#### **3.5.1 Extratos etanólicos de resíduos vegetais**

Para avaliar o efeito de extratos de espécies vegetais cultivadas, foram coletados resíduos culturais de milho, feijão, aveia, trigo, ervilhaca e milho nas áreas experimentais da Fazenda Experimental da Faculdade de Ciências Agrárias. Os resíduos culturais foram

desidratados por 48 h em estufa com circulação de ar e temperatura ajustada para 55°C e moídos em moinho elétrico. Esse material foi levado ao Laboratório de Química da UFMS de Campo Grande, onde foi extraído com etanol, a frio. O extrato etanólico foi concentrado sob pressão reduzida, até consistência pastosa ou xaroposa.

### **3.5.2 Partição dos extratos etanólicos obtidos dos resíduos vegetais**

Os extratos etanólicos avaliados descritos no item 3.6.1 foram encaminhados ao Laboratório LP-1 (Departamento de Química da UFMS), em Campo Grande, onde foram realizadas partições em funil de separação com diferentes solventes, sendo obtidas as fases correspondentes, de acordo com o seguinte procedimento:

Os extratos etanólicos foram re-dissolvidos em metanol-água (9:1) e submetidos à partição em funil de separação, primeiramente com hexano, obtendo-se assim a fase hexânica. Em seguida, acrescentou-se água à fase hidrometanólica até se obter uma solução contendo metanol-água (1:1). Esta solução foi novamente submetida a uma partição em funil de separação com diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) e depois, com acetato de etila (Ac OEt). Desta maneira, foram obtidas as fases hexânica,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Ac OEt e hidrometanólica (metanol-água 1:1).

## **3.6 Procedimentos padronizados**

Neste item serão descritos todos os procedimentos que foram comuns à todos os ensaios realizados neste estudo.

### **3.6.1 Desinfestação dos escleródios**

Este procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. A desinfestação superficial dos escleródios foi feita pela imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2% por um minuto, e em seguida em água estéril, também por um minuto. Posteriormente, os escleródios foram postos a secar em placas de Petri forradas com papel filtro esterilizado.

### **3.6.2 Substrato ágar-água**

Em todos os ensaios foram utilizados gerboxes. Em cada gerbox foi vertido volume de ágar-água fundente suficiente para formar uma camada de 4 mm cobrindo todo o fundo do recipiente. O substrato ágar-água, na concentração 1,7%, havia sido previamente esterilizado em autoclave à 120°C/1atm/20'.

### **3.6.3 Distribuição dos escleródios**

Vinte escleródios foram distribuídos com equidistância em cada gerbox, com o uso de papel milimetrado (11x11 cm) marcado, colocado sob o gerbox. Quando o experimento se tratava de extratos de vegetais, após a distribuição dos escleródios, uma camada de ágar-água foi vertida sobre os escleródios para evitar o rolamento acidental. Nos ensaios que envolveram resíduos culturais, o procedimento de recobrir os escleródios não foi realizado.

Depois que os tratamentos haviam sido aplicados, os gerboxes eram identificados e vedados com filme plástico.

### **3.6.4 Incubação**

Os gerboxes foram incubados em câmara com ajuste de temperatura (°C) e fotoperíodo. Os gerboxes foram mantidos em temperatura de 18°C e fotoperíodo de 12 horas luz/12 horas escuro.

### **3.6.5 Delineamento experimental, avaliação e análise de dados**

Em todos os ensaios conduzidos neste estudo, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, e o número de tratamento variando para cada ensaio. Cada unidade experimental foi constituída por uma caixa plástica tipo “gerbox” (11x11x3,2cm) contendo 20 escleródios cada.

As avaliações tiveram início a partir da verificação de formação de estipes e apotécios no tratamento testemunha.

As coletas dos dados foram realizadas mediante contagem das estruturas (estipe e apotécios) em cada escleródio, com a utilização de contador manual de mesa. Foram

registrados o número total de estipes e apotécios, número total de apotécios e calculado o número de apotécios por escleródio e a porcentagem de germinação carpogênica.

As avaliações foram encerradas quando foi observado que a germinação dos escleródios estabilizou-se. Ao final das avaliações, nos ensaios em que houve a inibição ou redução da germinação carpogênica dos escleródios, aqueles escleródios que não germinaram e que apresentavam bom estado de conservação (sem contaminantes e com consistência firme) foram lavados por três vezes em água esterilizada e transferidos para gerbox contendo ágar-água e incubados, para verificar o caráter temporário ou permanente, da inibição.

Os dados de porcentagem de germinação carpogênica foram transformados em Arco seno da raiz quadrada de  $(Y+1)/100$ , e os demais em raiz quadrada de  $(Y+1)$  para a análise de variância e os testes de média LSD de Fischer. Foi utilizado o programa estatístico SAS.

### **3.7 Avaliação do efeito dos extratos vegetais de plantas do cerrado sobre a germinação carpogênica de *S. sclerotiorum***

#### **3.7.1 Extratos vegetais dissolvidos em dimetilsulfóxido**

O experimento constou de 12 tratamentos, sendo 10 de extratos etanólicos de vegetais mostrados no Quadro 1 e os tratamentos testemunha ágar-água e ágar-água + dimetilsulfóxido (DMSO) a 2%.

Cada extrato etanólico do vegetal foi previamente dissolvido em DMSO na proporção 0,5g de extrato e 9,5 ml do solvente. Procedeu-se então a agitação em agitador elétrico até a dissolução completa do extrato. A solução do extrato vegetal foi adicionada a 490 mL de solução de ágar-água, resultando em concentração final com 1,9% de DMSO, 0,1% de extrato e 1,7% de ágar. Os extratos dissolvidos foram vertidos em gerbox. Após solidificação da solução, os escleródios foram distribuídos e então novamente vertida a solução fundente e resfriada correspondente ao mesmo tratamento, a fim de recobrir os escleródios para evitar o rolamento superficial. Os gerboxes foram vedados e incubados na câmara incubadora.

**Quadro 1.** Classificação botânica e parte\* da planta da qual foi obtido o extrato etanólico e data de coleta. Dourados/2007.

Família	Nome científico	Parte da planta usada	Local e Data da coleta
Bignoniaceae	<i>Tabebuia heptaphylla</i>	Periderme	Corumbá /Março 2001
Bignoniaceae	<i>Tabebuia caraiba</i>	Folhas	Campo Grande/Março 2002
Bignoniaceae	<i>Tabebuia caraiba</i>	Periderme	Campo Grande/Março 2004
Combretaceae	<i>Combretum laxum</i>	Folhas	Corumbá/Outubro 2004
Combretaceae	<i>Combretum laxum</i>	Galhos	Corumbá /Outubro 2004
Lauraceae	<i>Ocotea minarum</i>	Frutos inteiros	Campo Grande/ Dezembro 2004
Lauraceae	<i>Ocotea minarum</i>	Periderme	Campo Grande/ Dezembro 2001
Lauraceae	<i>Ocotea minarum</i>	Cerne	Campo Grande/ Dezembro 2001
Lauraceae	<i>Ocotea suaveolens</i>	Folhas	Corumbá /Outubro 2004
Sapindaceae	<i>Magonia pubescens</i>	Sementes	Campo Grande/Agosto 2004

\*Informações cedidas pela prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Fernanda Garcez.

### 3.7.2 Extratos vegetais dissolvidos em água

Foram avaliados os extratos vegetais das espécies relacionadas no Quadro 2. Os extratos etanólicos foram obtidos junto ao Laboratório de Química da UFMS, conforme descrito no item 3.4.1. O ensaio constou de sete tratamentos (seis extratos vegetais e testemunha ágar-água). Os extratos vegetais foram dissolvidos em tubos de ensaio, com água estéril, na proporção de 0,5 g de extrato e 9,5 mL de água estéril. Para melhor dissolução, os tubos foram colocados em banho-maria durante 20 minutos em temperatura de 53°C e posteriormente, agitados em agitador elétrico até a dissolução do extrato. Os extratos vegetais, acrescidos de 490 mL de solução ágar na proporção de 1,7% foram transferidos para gerbox, formando uma camada de aproximadamente 4 mm, e em cada uma dessas caixas plásticas foram distribuídos equidistantes vinte escleródios. Posteriormente verteu-se sobre os escleródios volume de ágar-água suficiente para cobri-los.

**Quadro 2.** Classificação botânica e parte\* da planta da qual foi obtido o extrato bruto e data da coleta. Dourados/2007.

Família	Nome científico	Parte da planta e extrato avaliado	Local e Data da coleta
Combretaceae	<i>Terminalia fagifolia</i>	Periderme ( ext. etanólico)	Aquidauana/Outubro 2004
Combretaceae	<i>Terminalia fagifolia</i>	Cerne (fase CH <sub>3</sub> CN/CHCl <sub>3</sub> )**	Aquidauana/Outubro 2004
Combretaceae	<i>Terminalia fagifolia</i>	Cerne (fase hexânica)**	Aquidauana/Outubro 2004
Combretaceae	<i>Combretum laxum</i>	Folhas (ext. etanólico)	Corumbá /Outubro 2004
Sapindaceae	<i>Magonia pubescens</i>	Sementes (ext. etanólico)	Campo Grande/Agosto 2004
Bignoniaceae	<i>Tabebuia heptaphylla</i>	Periderme (ext. etanólico)	Corumbá/Março 2001

\*Informações cedidas pela profª. Drª Fernanda Garcez.

\*\*As fases hexânica e CH<sub>3</sub>CN/CHCl<sub>3</sub> foram obtidas da partição do extrato etanólico do cerne com hexano/CH<sub>3</sub>CN/CHCl<sub>3</sub>/água (20:34:10:10).

### 3.8 Efeito de concentrações de solventes

O ensaio constou de sete tratamentos: dimetilsulfóxido a 1%, 0,5% e 0,25%, etanol a 2%, 0,5% e 0,25% e testemunha (ágar-água). Para obtenção das concentrações avaliadas foram preparados em erlenmeyers, 0,5 L de soluções de ágar-água com 1,7% de ágar. Após esterilização e posterior resfriamento, com a solução ainda fundente foram acrescentados volumes necessários às respectivas concentrações dos solventes e a solução foi vertida nos gerboxes e os escleródios foram distribuídos.

### 3.9 Avaliação do efeito de resíduos culturais de plantas cultivadas sobre a germinação carpogênica de *S. sclerotiorum*.

#### 3.9.1 Camada de resíduos de plantas cultivadas sobre os escleródios

Resíduos de soja, milho, trigo, milheto, aveia, feijão e ervilhaca foram estudados. Neste ensaio além dos resíduos havia duas testemunhas, testemunha solo e testemunha ágar-água.

Escleródios do isolado Jotabasso, produzidos conforme descrito no item 3.3 foram utilizados neste ensaio. Após solidificação da solução ágar-água, os escleródios foram distribuídos equidistantes em cada gerbox. Os escleródios do tratamento testemunha foram cobertos com uma camada 2 mm de ágar-água, para evitar rolamento acidental, e aqueles dos



tratamentos com resíduos culturais e com solo, foram cobertos com camada de 4 mm do respectivo tratamento. O solo utilizado (Latosolo vermelho-distroférico) foi coletado na área experimental do NCA, seco ao ar, peneirado e esterilizado com Brometo de metila.

### **3.9.2 Resíduos de plantas cultivadas incorporados ao ágar-água**

Os tratamentos avaliados foram sete, sendo os resíduos de milho, feijão, ervilhaca, aveia, milho, trigo e testemunha ágar-água. Neste ensaio o resíduo cultural foi incorporado ao ágar-água ainda fundente. Após a solidificação do substrato foi feita a distribuição equidistante dos escleródios nos recipientes, que foram em seguida vedados e incubados nas condições já descritas.

### **3.9.3 Resíduos de plantas cultivadas desinfestados com tratamento térmico**

Os resíduos estudados neste ensaio foram os mesmos do ensaio anterior. Porém os resíduos foram submetidos a dois métodos de assepsia, a esterilização e pausterização (eliminação de microrganismos indesejáveis). Para esses procedimentos, os resíduos foram acondicionados em erlenmeyers que foram vedados e esterilizados em autoclave (120°C/1atm/60'). Este procedimento foi repetido durante três dias consecutivos. Para a pasteurização os resíduos foram à estufa de circulação forçada de ar (60°C/60') durante três dias consecutivos. Após a distribuição equidistante dos escleródios, os resíduos foram distribuídos formando uma camada de aproximadamente 4 mm. Os gerboxes foram vedados e incubados nas condições já descritas.

## **3.10 Avaliação do efeito de extratos de resíduos de plantas cultivadas e germinação carpogênica de *S. sclerotiorum*.**

### **3.10.1 - Extratos etanólicos de resíduos de plantas cultivadas**

Sete tratamentos com cinco repetições foram estudados neste ensaio, extratos etanólicos de seis resíduos culturais e testemunha ágar-água.

Os extratos etanólicos foram processados conforme descrito no item 3.5.1.

### 3.10.2 – Fases obtidas da partição dos extratos etanólicos de resíduos de plantas cultivadas

Foram estudadas 12 fases provenientes da partição com solventes dos extratos etanólicos obtidos dos resíduos culturais (item 3.5.2), as quais estão descritas no Quadro 3, totalizando, neste ensaio, 13 tratamentos, com a testemunha ágar-água. Os procedimentos para dissolução desses extratos fracionados foram os mesmos do ensaio anterior, exceto a concentração da solução final, que foi de 100 ppm.

**Quadro 3.** Nome científico e nome comum das plantas da qual foram obtidos os extratos etanólicos e as \*fases correspondentes. Dourados/2007.

Nome comum	Nome científico	Fases testadas (obtidas da partição do extrato etanólico) <sup>1</sup>
Aveia	<i>Avena sativa</i>	MeOH-H <sub>2</sub> O, Hexânica, Diclorometano e Acetato de etila
Ervilhaca	<i>Vicia sativa</i>	Hexânica, Diclorometano e Acetato de etila
Trigo	<i>Triticum aestivum</i>	Diclorometano
Feijão	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Hexânica
Milheto	<i>Pennisetum glaucum</i>	Hexânica, Diclorometano e Acetato de etila

\* Informações cedidas pela prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Fernanda Garcez.<sup>1</sup> O extrato etanólico foi re-dissolvido em metanol-água (9:1). Fez-se uma partição em funil de separação com hexano, obtendo-se assim a fase hexânica. Acrescentou-se água à fase hidrometanólica até se obter uma solução contendo metanol-água (1:1). Esta solução foi novamente submetida a uma partição em funil de separação com diclorometano e em seguida, com acetato de etila, obtendo-se as fases diclorometano e acetato de etila.

### 3.11 Efeito de diferentes níveis de pH na germinação carpogênica

O efeito de diferentes níveis de pH sobre a germinação carpogênica de *S. sclerotiorum* foi estudado. O pH da solução de ágar-água foi aferido quando em estado fundente com peagâmetro digital. Os níveis de pH estudados foram o três, quatro, cinco, seis e sete. Para obtenção do pH desejado, titulou-se o meio com soluções de 0,1M de ácido clorídrico (HCl) para acidificação e 0,2 M de hidróxido de sódio (NaOH) para alcalinização. Além dos tratamentos já mencionados foram incluídos os seguintes tratamentos, testemunha, extratos etanólicos de aveia, ervilhaca e milheto. Em todos foi feita aferição do pH, tanto da testemunha quanto do extrato diluído em água e da solução formada com a mistura com ágar-água.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Extratos vegetais de plantas do cerrado e germinação carpogênica

#### 4.1.1 Avaliação do efeito dos extratos de plantas do cerrado dissolvidos em DMSO sobre a germinação carpogênica de *S. sclerotiorum*

Foram realizadas duas avaliações, sendo a primeira aos 54 dias após a instalação do ensaio (DAI) e a segunda, aos 69 dias. Na primeira avaliação, não foi observada a emissão de apotécios nos escleródios submetidos aos extratos de plantas do cerrado e na testemunha com DMSO. No tratamento ágar-água (testemunha) aproximadamente oito escleródios apresentavam formação de apotécio, ou seja, 40% dos escleródios germinaram carpogenicamente. Aos 69 dias, as testemunhas apresentavam 45% dos escleródios com emissão de apotécios e 1,2 apotécios por escleródio. Escleródios de todos os demais tratamentos tiveram a germinação suprimida. A não emissão de apotécios em todos os tratamentos em que o DMSO foi utilizado demonstra que o solvente, na concentração utilizada, suprimiu a formação de estipes e apotécios.

Após a última avaliação, os escleródios não germinados foram coletados e lavados por três vezes em água corrente e transferidos para gerboxes contendo ágar-água, em ambiente favorável à germinação carpogênica. O efeito supressor foi permanente sem que tenha ocorrido nem mesmo emissão de estipes.

#### 4.1.2 Avaliação do efeito dos extratos vegetais plantas do cerrado dissolvidos em água sobre a germinação carpogênica de *S. sclerotiorum*

A germinação carpogênica no tratamento testemunha evoluiu de 15%, aos 50 DAI, a 51 % na última avaliação (Quadro 4). Aos 50 DAI, embora escleródios tratados com extratos obtidos da periderme de *Tabebuia heptaphylla* e do cerne (Figura 1A) de *Terminalia fagifolia* (fase hexânica) tenham apresentado formação de apotécios, a porcentagem de germinação foi inferior à testemunha. Escleródios expostos a extratos de *Terminalia fagifolia*, extrato da

periderme (Figura 1B), e *Terminalia fagifolia*, extrato do cerne (fase ACN/CHCl<sub>3</sub>) *Magonia pubescens*, extrato de sementes (Quadro 5), não emitiram estipes ou apotécios revelando o efeito supressor daqueles extratos.

**Quadro 4.** Germinação carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum* sob efeito de extratos plantas do cerrado dissolvidos em água, aos 50, 65 e 75 dias após a instalação do ensaio (DAI). Dourados/2007.

Espécies/ parte utilizada da planta	Germinação carpogênica (%)		
	50 dias	65 dias	75 dias
Testemunha	15,0a	35,0a	51,0a
<i>Combretum laxum</i> - periderme	14,0a	31,0ab	41,0a
<i>Tabebuia heptaphylla</i> - periderme	4,0ab	8,0bc	15,0b
<i>Terminalia fagifolia</i> - cerne (f. hexânica)	3,0ab	8,0bc	9,0bc
<i>Terminalia fagifolia</i> - cerne (f. ACN/CHCl <sub>3</sub> )	0,0b	4,0c	9,0bc
<i>Terminalia fagifolia</i> - periderme	0,0b	0,0c	0,0c
<i>Magonia pubecens</i> - sementes	0,0b	0,0c	0,0c
C.V. (%)	90,43	99,98	42,90

Os dados foram transformados em arco seno raiz de  $(x+1)/100$  para análise estatística e teste de médias. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de LSD de Fischer ( $\alpha=0,05$ ).

Nas segunda (65 DAI) e terceira avaliações (75 DAI), o efeito supressor dos extratos de *T. fagifolia* extraído da periderme e *M. pubecens* extraído das sementes, foi confirmado com a ausência total de apotécios nos escleródios. Este resultado foi semelhante ao encontrado por Stefanello *et al.* (2006) que estudaram o efeito de extratos de árvores do cerrado e verificaram efeito supressor na germinação carpogênica por extratos de *Tabebuia heptaphylla*. Os mesmos autores encontraram efeito supressor do extrato de *Combretum laxum*, porém neste estudo não houve diferença entre *C. laxum* e testemunha (Figura 1D), o que revela a ausência do efeito relatado.

Os tratamentos com extratos de *Combretum laxum*, (caules e folhas), *Tabebuia heptaphylla* (periderme), e *Terminalia fagifolia* (cerne - fase ACN/CHCl<sub>3</sub>) apresentaram alguns escleródios com germinação carpogênica aos 50 DAI, porém 60% dos escleródios apresentavam germinação miceliogênica, e posterior formação de pequenos escleródios secundários (Figura 1C), o que sugere que o patógeno utilizou nutrientes do extrato. Na formação de escleródios, três fases distintas ocorrem, a iniciação, desenvolvimento e

maturação, caracterizando a diferenciação morfológica e bioquímica dos escleródios, sendo a primeira e a última destas fases afetadas entres outros fatores, pela ausência de nutrientes (HAREL *et al.* 2005). Segundo LeTorneau (1979) os escleródios devem ser colocados em substratos com escassez de nutrientes para favorecer a germinação carpogênica, do contrário ocorre a germinação miceliogênica.

**Quadro 5.** Número médio de apotécios formados por escleródios de *S. sclerotiorum* sob efeito de extratos plantas do cerrado dissolvidos em água, aos 50 e 65 e 75 DAI. Dourados/2007.

Espécies/ parte utilizada da planta	Número de apotécios por escleródios		
	50 dias	65 dias	75 dias
Testemunha	3,9a	8,0a	9,3a
<i>Combretum laxum</i> - periderme	3,2ab	4,4ab	8,8a
<i>Tabebuia heptaphylla</i> - periderme	1,8ab	1,8b	2,6b
<i>Terminalia fagifolia</i> - cerne (f. hexânica)	0,8ab	1,4b	1,1b
<i>Terminalia fagifolia</i> - cerne (f. ACN/CHCl <sub>3</sub> )	0,0b	1,0b	2,0b
<i>Terminalia fagifolia</i> - periderme	0,0b	0,0c	0,0b
<i>Magonia pubecens</i> - sementes	0,0b	0,0c	0,0b
C.V. (%)	49,30	49,50	35,70

Dados transformados em raiz quadrada de (x+1) para análise estatística e teste de médias.

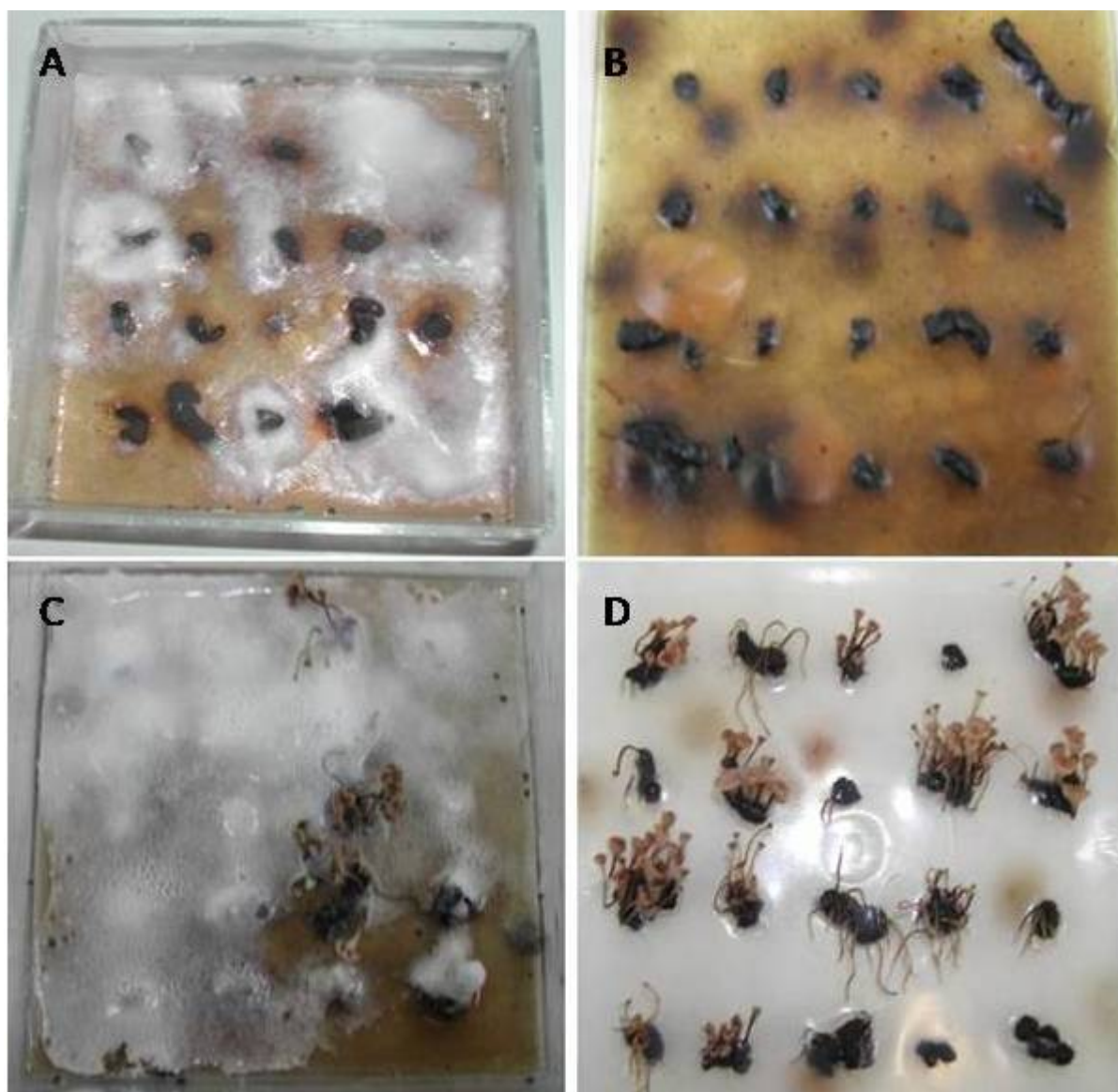
Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de LSD de Fischer ( $\alpha = 0,05$ ).

*Tabebuia heptaphylla* – periderme, *T. fagifolia* - cerne (f. hexânica) e *T. fagifolia* - cerne (f. ACN/CHCl<sub>3</sub>) tiveram comportamento intermediário entre os tratamentos com maior número de escleródios germinados carpogenicamente (testemunha e *C. laxum*), e aqueles que apresentaram efeito supressor *T. fagifolia* e *M. pubecens*, tendo apresentado porcentagem de germinação estatisticamente menor em relação à testemunha e *C. laxum*.

Em relação ao número de apotécios por escleródio (Quadro 5), na primeira avaliação a testemunha apresentou maior número de apotécios produzidos por escleródio, sendo estatisticamente igual à *C. laxum* - periderme, *T. heptaphylla* - periderme e *T. fagifolia* - cerne.

Nas segunda e terceira avaliações, *C. laxum* - periderme, produziu números de apotécios por escleródio igual à testemunha. *Terminalia fagifolia* - cerne (f. hexânica), *T.*

*heptaphylla* - periderme, *T. fagifolia* - cerne (fase ACN/CHCl<sub>3</sub>), mesmo com germinação carpogênica, tiveram significativa redução no número de apotécios formados por escleródio.



**FIGURA 1.** Escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* tratados com extratos de plantas do cerrado dissolvidos em água. *Terminalia heptaphylla* obtido da periderme, aos 50 DAÍ (A); *Terminalia fagifolia* obtido da periderme, aos 75 DAÍ (B); *Terminalia fagifolia* obtido do cerne (Fase ACN/CHCl<sub>3</sub>) aos 75 DAI (C) e Tratamento testemunha) aos 75 DAÍ (D).

#### 4.2 Efeito de concentrações de solventes em ágar-água sobre germinação carpogênica de *S. sclerotiorum*

Foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos, em todas as avaliações realizadas. Os escleródios advindos da testemunha apresentaram maior germinação carpogênica e maior número de apotécios por escleródio em todas as épocas de avaliação (42, 50 e 65 dias após a instalação do ensaio) diferindo estatisticamente da maior parte dos tratamentos avaliados (Quadros 6 e 7).

**Quadro 6.** Germinação carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum* sob efeito de diferentes concentrações dos solventes dimetilsulfóxido (DMSO) e etanol em ágar-água aos 42, 50 e 65 DAI. Dourados/2007.

Tratamento	Germinação carpogênica (%)		
	42 dias	50 dias	65 dias
Testemunha	41,0a	48,0a	61,0a
DMSO (0,25%)	21,0ab	29,0ab	46,0ab
DMSO (0,50%)	17,0b	27,0ab	3,0abc
DMSO (1%)	7,0b	10,0b	20,0bc
Etanol (0,25%)	4,0b	9,0b	14,0bc
Etanol (0,50%)	1,0b	7,0b	12,0c
Etanol (2,0%)	0,0b	0,0b	0,0c
C.V. (%)	103,10	93,90	71,10

Dados foram transformados em arco seno raiz de  $(x+1)/100$  para análise estatística e teste de médias.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de LSD de Fischer ( $\alpha = 0,05$ ).

Na primeira avaliação não houve diferença na porcentagem de germinação carpogênica entre testemunha e DMSO 0,25%. Comparando apenas os tratamentos com solvente e respectiva concentração (Quadro 6) é possível observar que não houve diferença estatística entre eles, embora consideráveis diferenças possam ser observadas. No tratamento com DMSO (0,25%) 21 % dos escleródios germinaram carpogenicamente, enquanto que em etanol à 2,0% (Figura A) não houve germinação carpogênica, mas miceliogênica.

Na segunda avaliação, comparando etanol 2,0% com zero e DMSO 0,25% com 29% de germinação carpogênica, e considerando o máximo potencial de germinação do tratamento

testemunha com 48%, verifica-se redução de 60% na germinação, que nesta situação é estatisticamente desconsiderada.

Na terceira avaliação, diferenças entre os tratamentos, para as duas características apresentadas foram encontradas (Quadros 6 e 7). O solvente DMSO nas concentrações 0,25% e 0,50% não tiveram efeito na porcentagem de germinação carpogênica quando comparados com testemunha. Escleródios expostos aos solventes DMSO (1%) e etanol (0,25%, 0,50% e 2,0%) tiveram porcentagem de germinação carpogênica significativamente menor.

Escleródios tratados com etanol a 2,0% e 0,5% apresentaram crescimento micelial na primeira época de avaliação, sendo confirmada a germinação miceliogênica com a formação intenso crescimento micelial na camada de ágar-água a partir da segunda avaliação. Em nenhuma época de avaliação, foram encontrados escleródios com germinação carpogênica quando tratados com etanol na concentração de 2%, (Quadro 7) o que nos permite afirmar que o etanol a 2% inibiu a germinação carpogênica dos escleródios utilizados neste ensaio. O efeito do etanol no desenvolvimento de fungos já foi relatado por Hutchinson (1973) citado por Leite *et al.* (1995), que identificou em espécies de *Rhizopus nigricans*, *Botrytis cinerea* e *Trichoderma viride* efeito inibitório no crescimento micelial, já em *Pestalotia rhododendri* o etanol inibiu a esporulação.

Diferenças consideráveis citadas anteriormente que não tiveram significativa diferença estatística podem ter ocorrido devido às características intrínsecas dos escleródios, que, por exemplo, mesmo produzidos a partir de um único isolado podem apresentar diferenças na variabilidade genética, podendo responder diferentemente ao tratamento recebido.

O período de incubação, tempo necessário para que o escleródio possa germinar carpogenicamente pode variar de 13 a 208 dias (Willets e Wong, 1980, citados por Phillips, 1987), podendo ter influenciado nos resultados obtidos. Características morfológicas como tamanho e bioquímicas como maturação funcional e composição, possivelmente determinam a viabilidade e até o “vigor” dos escleródios e podem resultar em reações diversas a fatores externos.

Na terceira avaliação, as variações foram acentuadas, possivelmente devido à estabilização do efeito dos tratamentos ou até devido à estabilidade natural da germinação carpogênica daquela população de escleródios, em função do maior período de tempo decorrido em relação às avaliações iniciais.



**Quadro 7.** Número médio de apotécios formados por escleródios de *S. sclerotiorum* sob efeito de diferentes concentrações de solventes em ágar-água aos 42 e 50 e 65 DAI.Dourados/2007.

Tratamento	Número de apotécios por escleródios		
	42 dias	50 dias	65 dias
Testemunha	1,5a	2,1a	2,8a
DMSO (1%)	1,3ab	1,4ab	2,0ab
DMSO (0,50%)	1,0abc	1,3ab	1,9ab
DMSO (0,25%)	0,7abc	1,1ab	1,6abc
Etanol (0,25%)	0,4bc	0,9ab	0,9bc
Etanol (0,50%)	0,2bc	0,5b	0,6bc
Etanol (2,00%)	0,0c	0,0b	0,0c
C.V. (%)	24,8	26,8	26,8

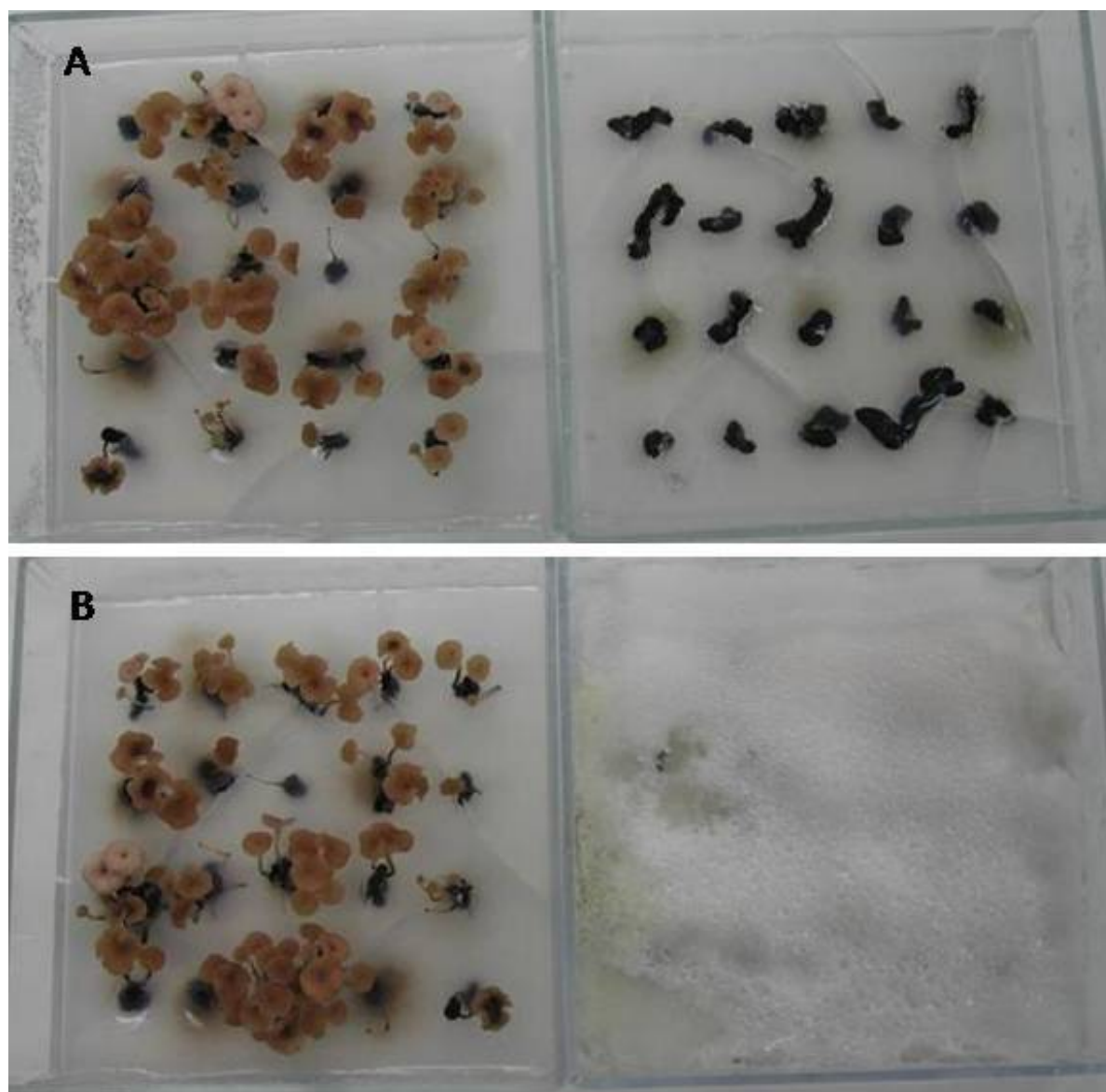
Dados transformados em raiz quadrada de  $(x+1)$  para análise estatística e teste de médias.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de LSD de Fischer ( $\alpha = 0,05$ ).

O solvente etanol reduziu o número de apotécios por escleródio. Além de redução no número de apotécios formados, pôde ser observado também que os apotécios formados sob o tratamento com etanol apresentavam coloração diferente em relação aos apotécios formados no tratamento testemunha, tendo sido observado nos apotécios tratados com etanol manchas escuras recobrimdo quase toda a face superior do apotécio.

Escleródios expostos ao DMSO também se apresentavam morfológicamente diferentes, tendo os apotécios formados a partir daqueles escleródios, aspecto atrofiado. As maiores diferenças nas características morfológicas observadas nos apotécios ocorreram naqueles formados em escleródios dos tratamentos com DMSO (1,0%), DMSO (0,50%) e DMSO (0,25%), que tiveram a média de apotécios formados por escleródio igual à testemunha.

O procedimento para verificar a natureza do efeito inibitório, tanto de etanol quanto de DMSO demonstrou efeito permanente de inibição da germinação carpogênica nos escleródios.



**FIGURA 2.** Escleródios de *S. sclerotiorum* submetidos a agar-água (testemunha) e ao solvente etanol na concentração de 2,0%. Testemunha versus Etanol (2,0%) aos 42 DAÍ (A); Testemunha versus Etanol (2,0%) aos 65 DAÍ (B).

### 4.3 Resíduos culturais de plantas cultivadas e germinação carpogênica

#### 4.3.1 Avaliação do efeito de camada de resíduos de culturas sobre os escleródios e sobre sua germinação carpogênica

Na primeira avaliação, aos 50 dias após a instalação do ensaio, só houve formação de apotécios no tratamento testemunha e com cobertura de solo (Quadro 8). Resultado semelhante foi encontrado por Rocha *et al.* (2006) que a nível de campo, estudaram o efeito de diferentes coberturas de solo e diferentes fungicidas na incidência de *S. sclerotiorum* em alface e encontraram menor incidência da doença em solos com algum tipo de cobertura.

**Quadro 8.** Germinação carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum* sob efeito de diferentes resíduos de plantas cultivadas sobre os escleródios em camada de  $\pm 4$  mm com remoção aos 50 DAI e posteriores avaliações aos 65 e 80 DAI Dourados/2007.

Tratamento	Germinação carpogênica (%)		
	50 dias (remoção dos resíduos)	65 dias	80 dias
Testemunha	68,0a	92,0a	92,0a
Solo	21,0b	31,0b	37,0b
Milho	0,0c	4,0c	21,0c
Trigo	0,0c	1,0c	12,0cd
Aveia	0,0c	0,0c	0,0d
Ervilhaca	0,0c	0,0c	0,0d
Feijão	0,0c	0,0c	0,0d
Milheto	0,0c	0,0c	0,0d
C.V. (%)	71,0	28,7	42,1

Os dados foram transformados em arco seno raiz de  $(x+1)/100$  para análise estatística e teste de médias. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de LSD de Fischer ( $\alpha = 0,05$ ).

Na segunda avaliação, maior porcentagem de germinação carpogênica foi encontrada na testemunha, seguida pelo tratamento com cobertura de solo (Figura 3A), sendo esses tratamentos estatisticamente diferentes entre si e entre os demais (Quadro 8).

A germinação carpogênica nos escleródios do tratamento com resíduos de milho e trigo só foi observada a partir da segunda avaliação. Provavelmente devido à remoção da

camada que formava uma barreira física, exercendo pressão mecânica naqueles escleródios. Outro fato que pode ter contribuído para esse comportamento é a maior incidência de luz nos escleródios após a remoção. Sung e Yang (2000) estudando fatores para produção de escleródios e formação de apotécios observaram que escleródios submetidos à alta intensidade luminosa desenvolveram apotécios em poucos dias e que ao contrário, várias semanas foram necessárias para a germinação carpogênica de escleródios quando a intensidade luminosa foi baixa.

Os escleródios provenientes do tratamento com ervilhaca apresentavam-se totalmente deteriorados devido a contaminação microbiana. Nos escleródios cobertos com resíduos de feijão (Figura 3E), milho (Figura 3F) e em alguns do tratamento com ervilhaca foram detectados microrganismos contaminantes, principalmente fungos (*Penicillium* ssp., *Fusarium* ssp. e *Aspergillus* ssp. entre outros não identificados). Ferraz *et al.* (2003), estudando a viabilidade de *S. sclerotiorum* após solarização do solo, na presença de cobertura morta, encontraram maior eficiência na inativação do patógeno quando maior incidência e variabilidade de contaminantes foram encontradas. Steadman (1979) destaca os gêneros *Trichoderma* e *Penicillium*, dentre os fungos que produzem substâncias inibidoras e metabólitos antifúngicos. De maneira geral, entre os efeitos provocados pelas substâncias inibidoras, pode ser observada a redução ou paralisação do crescimento e esporulação, redução na germinação de esporos, além de distorções na hifa e endólise (Campbell, 1989 citado por Lobo Junior e Abreu, 2000).

Na terceira avaliação, a porcentagem da germinação carpogênica na presença de resíduos de milho e trigo teve aumento considerável, embora inferior aos tratamentos testemunha (Figura 3B) e cobertura com solo, sendo que com resíduo de milho foi superior aos tratamentos que tiveram efeito na supressão da germinação carpogênica. Melo *et al.* (2004), também estudaram o efeito de resíduos culturais sobre *S. sclerotiorum* encontraram maior porcentagem de germinação carpogênica com cobertura de milho, aveia+ervilhaca peluda+nabo e em restos culturais de um sistema envolvendo a cultura do trigo.

Em relação aos tratamentos que tiveram os escleródios cobertos, observou-se que as maiores porcentagens de germinação carpogênica ocorreram no tratamento com cobertura com solo, isso provavelmente por que a textura do solo possibilitou melhor arejamento e presença de luz para os escleródios, pois para que a germinação carpogênica ocorra os

escleródios devem receber luz (Phillips, 1987). A cobertura com resíduos de culturas triturados formaram uma camada compacta o que pode ter reduzido a presença de luz, o que



**FIGURA 3.** Germinação de escleródios de *S. sclerotiorum*, mantidos sob camada de solo (A), agar-água (B) e resíduos da cultura do milho (C) resíduos de aveia (D), resíduos de feijão (E) e resíduos de milheto (F) aos 65 DAI.

pode ter sido a causa da germinação carpogênica ter sido retardada em relação à testemunha e cobertura com solo, sendo observada apenas a partir da segunda avaliação, aos 65 dias.

No tratamento com aveia foi observada a presença de contaminantes, porém após a retirada dos resíduos houve a germinação miceliogênica dos escleródios (Figura 3D), e para a confirmação desta informação, foi feito o plaqueamento e isolamento de *S. sclerotiorum* a partir de micélios desenvolvidos nos gerboxes do tratamento com aveia.

Não houve germinação carpogênica nos escleródios cobertos com resíduos de feijão, milho, ervilhaca e aveia. Resultado semelhante foi encontrado, em campo, por Lobo Jr *et al.* (1998), que relataram ausência ou número reduzido de apotécios, em áreas com plantio de gramíneas. Schwingel (2006), em estudos em laboratório, também encontrou efeito supressor na germinação carpogênica de escleródios cobertos com resíduos de gramíneas do gênero *Brachiaria*, sendo entre as espécies a *B. decumbens*, *B. dictioneura* e *B. brizantha* cv. La Libertad as mais eficientes. Costa (2003) também detectou efeito da palhada de *Brachiaria brizantha* na redução no número de escleródios (inóculo inicial) em ensaios a campo. O efeito da palhada de milho na redução de inóculo inicial, também foi observado.

Em relação ao número de apotécios formados, na primeira avaliação apenas os escleródios oriundos do tratamento com cobertura de solo e tratamento testemunha emitiram apotécios (Quadro 9). Este resultado foi semelhante ao encontrados por Ferraz *et al.* (1999) que demonstraram ser possível reduzir a emissão de apotécios com a cobertura do solo com palha. Gracia-Garza e Boland (1998) também já relataram a redução do número de apotécios em solo de plantio direto, cuja camada de palha picada de milho ou trigo foi mantida sobre o solo. Ferraz *et al.* (2001) encontraram menor número de apotécios, incidência e severidade de *S. sclerotiorum* em tratamentos com palha de *Amaranthus* sp. e nim.



**Quadro 9.** Número de apotécios por escleródio de *S. sclerotiorum* germinados carpogenicamente, sob efeito de diferentes resíduos de plantas cultivadas sobre os escleródios em camada de  $\pm 4$  mm com remoção aos 50 DAI e posteriores avaliações aos 65 e 80 DAI. Dourados/2007.

Tratamento	Número de apotécios por escleródio		
	50 dias	65 dias	80 dias
Testemunha	5,0a	16,6a	8,2a
Solo	2,4b	3,7ab	4,5b
Milho	0,0c	0,7bc	4,3b
Trigo	0,0c	0,2c	2,3bc
Aveia	0,0c	0,0c	0,0c
Ervilhaca	0,0c	0,0c	0,0c
Feijão	0,0c	0,0c	0,0c
Milheto	0,0c	0,0c	0,0c
C.V. (%)	28,5	44,8	33,8

Dados transformados em raiz quadrada de  $(x+1)$  para análise estatística e teste de médias.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de LSD de Fischer ( $\alpha = 0,05$ ).

Na segunda e terceira avaliações quando a camada de resíduos foi removida, houve a formação de apotécios nos escleródios do tratamento com resíduos de milho e trigo, essa supressão inicial pode ser devido ao efeito camada de resíduos atuando como barreira física, exercendo pressão mecânica sobre os escleródios, ou na redução da incidência de luz, que é um dos três fatores considerados mais importantes para a germinação carpogênica dos escleródios (SUNG e YANG, 2000).

O número de apotécios formados nos escleródios que receberam cobertura com resíduos de milho (Figura C e Quadro 9) e de trigo foi estatisticamente inferior àqueles da testemunha e tratamento com solo. Ferraz *et al.* (2001), investigando o efeito da cobertura morta sobre o solo, no cultivo do feijoeiro, na formação de apotécios, encontraram maior número de apotécios nos tratamentos controle (sem cobertura e com palhada de feijoeiro).

Devido ao alto índice de contaminação, e conseqüentemente, deterioração dos escleródios cobertos com resíduos de aveia, feijão, milheto e em alguns dos escleródios cobertos com resíduos de ervilhaca, não foi possível observar nesses tratamentos o suposto efeito de barreira física, na supressão inicial da germinação carpogênica o que pode ser observado nos escleródios dos tratamentos com resíduos de milho e trigo.

De maneira geral, além da possível atuação de substâncias liberadas pelos resíduos, capazes de reduzir ou suprimir a germinação dos escleródios e da própria camada de resíduo formando uma barreira física, o que dificulta a emissão das estruturas que caracterizam a germinação carpogênica, e reduz a incidência de luz, o efeito indireto da população microbiana associada aos resíduos, produzindo substâncias voláteis ou liberando metabólitos tóxicos pode ter contribuído para a inibição ou redução da germinação carpogênica dos escleródios nesse ensaio.

Embora não tenha sido objeto de estudo elucidar o desenvolvimento de microrganismos nos resíduos culturais e a sua influência na germinação dos escleródios, não podem ser descartados os possíveis efeitos mencionados.

#### **4.3.2 Avaliação do efeito resíduos de cultura incorporados ao ágar-água sobre a germinação carpogênica de *S. sclerotiorum***

Na primeira avaliação (45 dias), apenas na testemunha houve germinação carpogênica (Quadro 10). No tratamento com resíduos de milho (Figura 4A) foi observada a formação de estipes. Já nos escleródios tratados com aveia, ervilhaca e milheto, houve germinação miceliogênica, e no tratamento com resíduos de trigo e feijão não ocorreu nenhum tipo de germinação ocorreu.

Na segunda avaliação (57 dias), os escleródios dos tratamentos feijão e milheto (Quadro 10) apresentavam níveis altos de contaminação (microrganismos) que impossibilitou a identificação dos escleródios e conseqüentemente à formação de estipes e apotécios. Já os escleródios dos tratamentos com ervilhaca e aveia, não apresentaram germinação carpogênica, mesmo na ausência de microrganismos contaminantes. O tratamento testemunha (Figura 4B) apresentou germinação carpogênica superior à todos os tratamentos estudados. Os escleródios submetidos aos tratamentos com resíduos de milho e trigo apresentaram 7,0 e 3,0 % de germinação carpogênica, respectivamente (Quadro 10).



**Quadro 10.** Germinação carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum* sob efeito de diferentes resíduos de cultura incorporados ao ágar-água aos 45 DAI e posteriores avaliações aos 57 e 69 DAI. Dourados/2007.

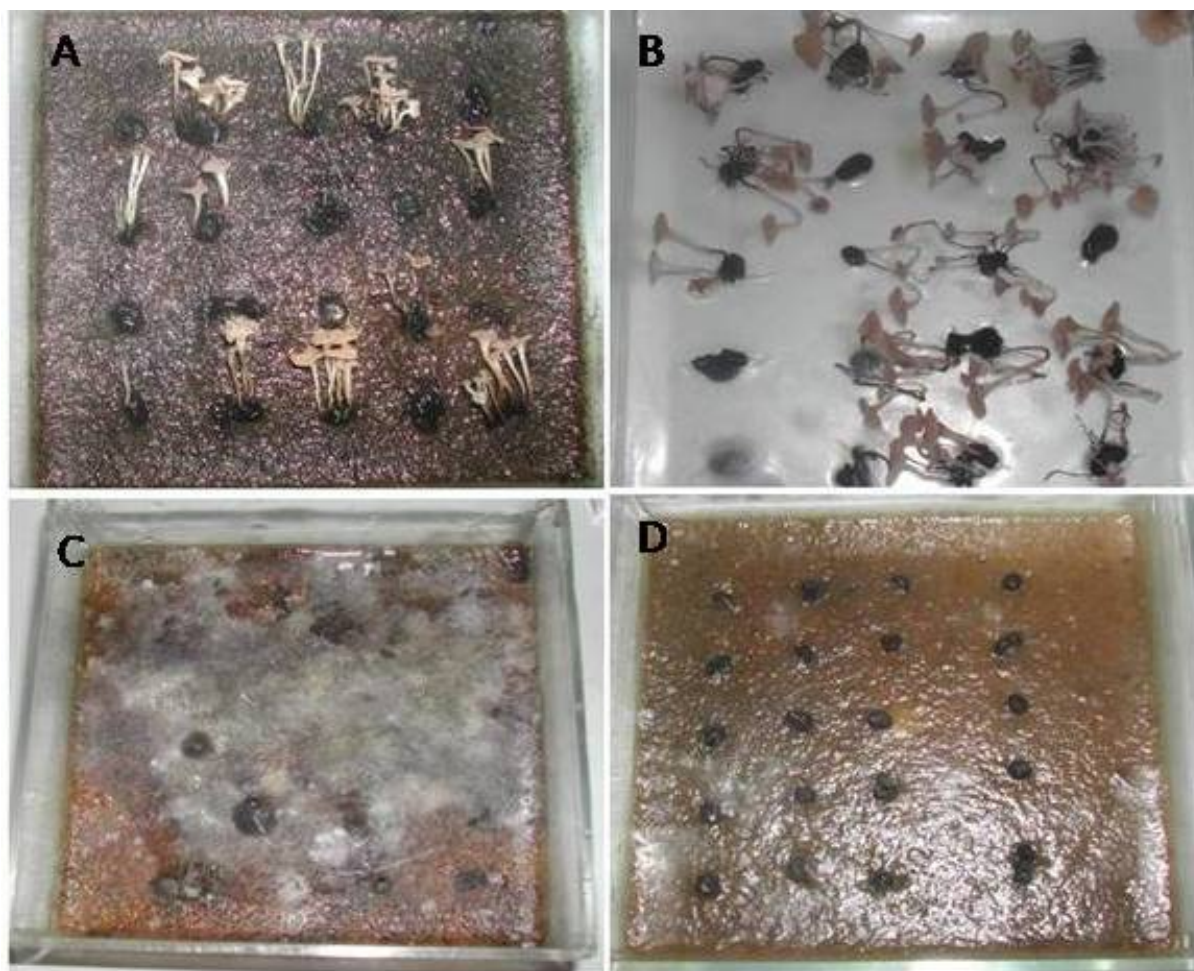
Tratamento	Germinação carpogênica (%)		
	45 dias	57 dias	69 dias
Testemunha	10,0a	25,0a	56,0a
Milho	0,0a	7,0b	45,0a
Trigo	0,0a	3,0bc	3,0b
Milheto	0,0a	0,0c	2,0b
Ervilhaca	0,0a	0,0c	0,0b
Feijão	0,0a	0,0c	0,0b
Aveia	0,0a	0,0c	0,0b
C.V. (%)	72,9	52,5	60,8

Os dados foram transformados em arco seno raiz de  $(x+1)/100$  para análise estatística e teste de médias. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de LSD de Fischer ( $\alpha = 0,05$ ).

O tratamento com aveia (Figura 4D) foi eficiente em suprimir a germinação carpogênica dos escleródios utilizados neste ensaio, uma vez que em nenhuma das avaliações foi observado níveis consideráveis de contaminação.

Na última avaliação (69 dias) o tratamento com resíduos de milho (Figura 4A) teve porcentagem de germinação carpogênica igual à testemunha (Figura B). Melo *et al.* (2004), em estudos de laboratório, encontraram maior número de apotécios por escleródio em restos culturais de milho em relação ao tratamento com cobertura com solo.

Houve aumento crescente no número de apotécios formados no decorrer das avaliações (Quadro 11). Na primeira avaliação apenas os escleródios do tratamento testemunha apresentaram formação de apotécios, porém não houve significativa diferença dos demais. Na segunda avaliação, nos tratamentos com resíduos de milho, trigo e milheto foi observada a formação de apotécios, porém estatisticamente igual aos tratamentos que não apresentaram germinação carpogênica.



**FIGURA 4.** Germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* influenciados por resíduos de plantas cultivadas incorporados ao substrato, aos 69 DAI. Apotécios emitidos de escleródios expostos a resíduos do milho (A), testemunha ágar-água (B), escleródios do tratamento com resíduos de milho (C), escleródios do tratamento com resíduos de aveia, com ausência de germinação carpogênica (D).

Aos 69 DAI, o tratamento com resíduo de milho teve produção de apotécios igual à testemunha. Em ensaios de laboratório, Simm *et al.* (2001) observaram que maior produção de apotécios foi observada na testemunha ágar-água e no tratamento com resíduos de milho como cobertura, após 50 dias de incubação.

**Quadro 11.** Número de apotécios por escleródio de *S. sclerotiorum* germinados carpogenicamente, sob efeito de diferentes resíduos de cultura incorporados ao ágar-água, aos 45 DAI e posteriores avaliações aos 57 e 69 DAI. Dourados/2007.

Tratamento	Apotécios por escleródios		
	45 dias	57 dias	69 dias
Testemunha	1,6a	2,9a	3,6a
Milho	0,0a	1,6b	2,8ab
Trigo	0,0a	0,6b	1,8bc
Milheto	0,0a	0,2b	0,5c
Ervilhaca	0,0a	0,0b	0,0c
Feijão	0,0a	0,0b	0,0c
Aveia	0,0a	0,0b	0,0c
C.V. (%)	25,7	28,0	32,4

Dados transformados em raiz quadrada de  $(x+1)$  para análise estatística e teste de médias.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de LSD de Fischer ( $\alpha = 0,05$ ).

Escleródios dos tratamentos ervilhaca, feijão e aveia não formaram apotécios (Quadro 11), o que caracteriza o efeito supressor da germinação carpogênica, nas condições em que foi conduzido o experimento. Em estudos no laboratório, a inibição da germinação carpogênica de *S. sclerotiorum* pelo efeito da cobertura com resíduos de aveia já foi relatado por Simm *et al.* (2001).

Os resultados desse ensaio demonstram que o efeito supressor dos resíduos de aveia observado no ensaio anterior não é devido apenas à população microbiana presente nos seus resíduos, pois nesse ensaio não houve o desenvolvimento de contaminantes e mesmo assim a supressão foi observada. Descarta-se também o efeito da barreira física, tanto pela pressão mecânica exercida ou pela redução da incidência de luz, pois neste ensaio não houve a condição (camada de resíduo) que propicia a ocorrência desses efeitos.

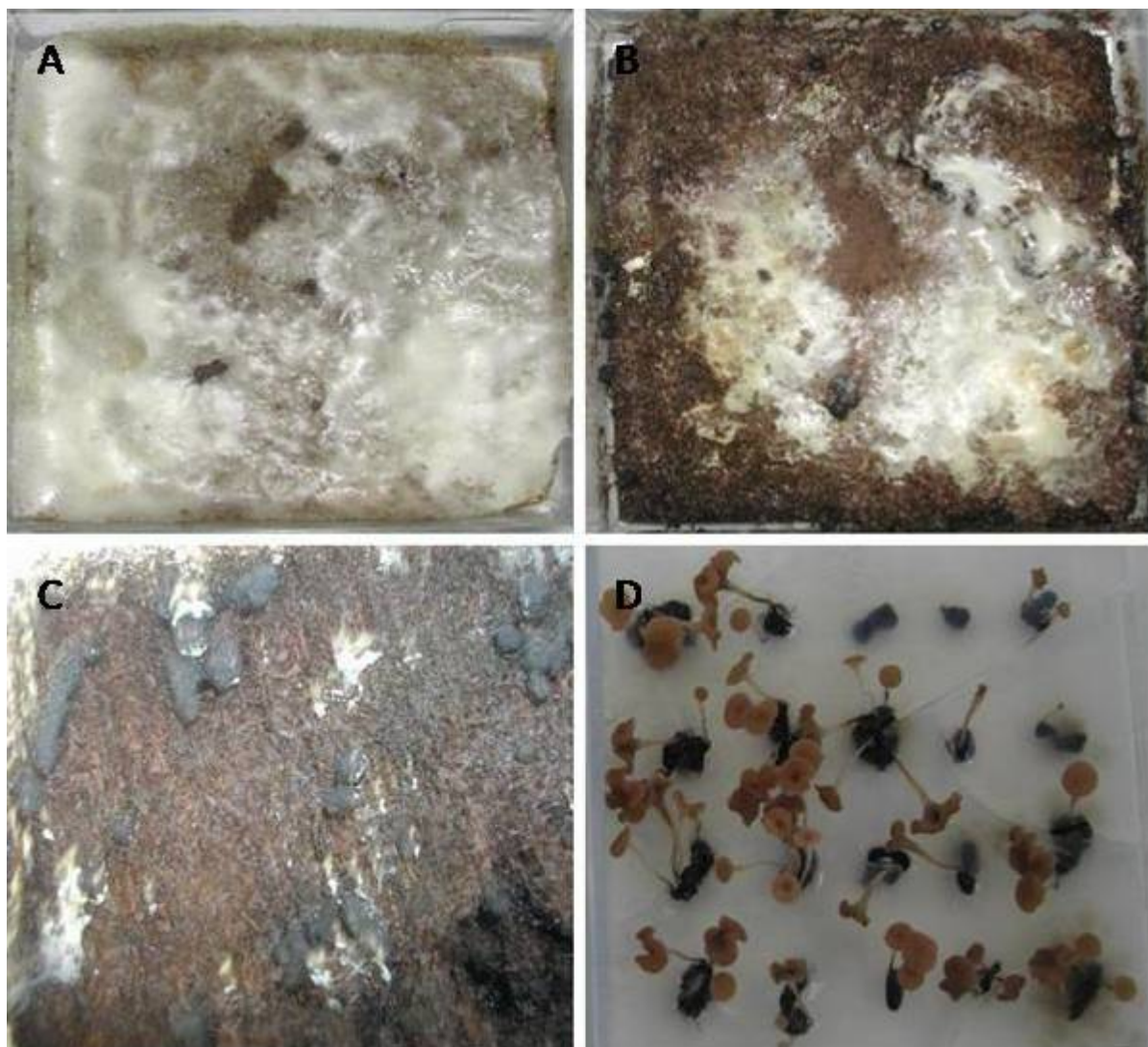
A incubação dos escleródios tratados com resíduos de aveia e ervilhaca, após a última avaliação, em ágar-água após tríplice lavagem com água esterilizada confirmou o efeito inibitório dos resíduos e o caracteriza como de efeito permanente, nas condições em que o ensaio foi conduzido.

#### **4.3.3 Avaliação do efeito resíduos de plantas cultivadas submetidos a tratamento térmico sobre a germinação carpogênica de *S. sclerotiorum***

Em todas as épocas de avaliação (até os 67 DAI) não houve germinação carpogênica exceto no tratamento testemunha que apresentou respectivamente 30%, 60% e 72 % de germinação carpogênica aos 52, 59 e 67 dias após a instalação do ensaio. Naqueles escleródios provenientes dos outros tratamentos nenhuma estrutura que caracteriza a germinação carpogênica foi identificada. Sung e Yang (2000), estudando fatores para produção de escleródios e formação de apotécios, observaram que escleródios submetidos à alta intensidade luminosa desenvolveram apotécios em poucos dias e que ao contrário, várias semanas foram necessárias para a germinação carpogênica de escleródios quando a intensidade luminosa foi baixa. Este fato pode sugerir que a camada de resíduo tenha influenciado na inibição da germinação carpogênica pela redução da luminosidade recebida pelos escleródios cobertos em relação aos descobertos (testemunha), ou ainda pelo efeito da pressão mecânica exercida pela camada de resíduos. Resultados semelhantes a esse foram encontrados por Gracia-Garza e Boland (1998) que observaram a redução do número de apotécios em solo de plantio direto, com camada de resíduo de milho e trigo que foram mantidas sobre o solo. Ferraz *et al.* (2001) também encontraram menor número de apotécios em tratamentos com cobertura com palha de *Amaranthus* sp. e nim.

Nos tratamentos com resíduos de aveia, trigo e milho (Figura A), submetidos à esterilização foi observada germinação miceliogênica. Quando os resíduos foram submetidos à pasteurização em todos os resíduos foi observado o desenvolvimento de hifas em todos eles. Nos gerboxes com resíduos de milho (Figura C) foi observada a formação de escleródios.

Nas segunda (59 DAI) e terceira avaliações 96 (DAI) , foi confirmado o efeito de todos os tratamentos na supressão da germinação carpogênica. Mesmo após a remoção da camada de resíduos, não houve germinação carpogênica nos tratamentos com os resíduos das culturas, apenas escleródios da testemunha apresentavam germinação carpogênica (Figura D). No tratamento com resíduos esterilizados de ervilhaca houve contaminação microbiana. Nos gerboxes com resíduos esterilizados de milho, aveia (Figura B), trigo e feijão foi observada a presença de escleródios formados a partir do desenvolvimento de hifas. Nos gerboxes do tratamento com resíduos de milho pasteurizado foram encontrados escleródios em formação e muitos já formados.



**FIGURA 5.** Escleródios em resíduos de diferentes culturas, submetidos a tratamentos térmicos e em ágar-água (testemunha), resíduos de milho, submetidos a esterilização, com germinação miceliogênica (A), resíduos de aveia, submetidos a esterilização, com germinação miceliogênica e formação de escleródios, aos 52 DAI (B), resíduos de milho, submetidos a pasteurização (C), e testemunha, aos 67DAI (D).

Provavelmente ao receberem tratamentos térmicos, os resíduos tiveram sua composição química alterada. Possivelmente houve solubilização de açúcares e outros nutrientes tornando o resíduo um meio enriquecido que favoreceu a germinação miceliogênica. Um dos fatores que influencia a germinação carpogênica é a presença ou não de fontes externas de nutrientes. Carboidratos tais como, glucose, manitol e sacarose podem inibir a germinação carpogênica, mas não a miceliogênica. A germinação carpogênica não requer fontes externas de nutrientes (LÊ TORNEAU, 1979).

#### 4.4 Extratos de resíduos de plantas cultivadas e germinação carpogênica

##### 4.4.1 Avaliação do efeito de extratos etanólicos de resíduos de plantas cultivadas sobre a germinação carpogênica de *S. sclerotiorum*

Na primeira avaliação (37 DAI), não houve diferença entre os tratamentos testemunha, trigo, milho e feijão. Testemunha foi superior à milho, ervilhaca e aveia, que não apresentaram germinação carpogênica (Quadro 12).

Aos 52 DAI, os escleródios tratados com extratos de resíduos de milho e trigo tiveram germinação carpogênica estatisticamente igual à testemunha.

Os extratos dos resíduos de aveia e ervilhaca mostraram-se eficientes em inibir a germinação carpogênica dos escleródios em todas as épocas de avaliação quando comparado com a testemunha (Quadro 12).

**Quadro 12.** Germinação carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum* sob efeito de diferentes extratos obtido de resíduos de culturas aos 37 DAI e posteriores avaliações aos 52 e 67 DAI. Dourados/2007.

Tratamento	Germinação carpogênica (%)		
	37 dias	52 dias	67 dias
Testemunha	12,0a	25,0a	56,0a
Trigo	10,0ab	22,0ab	53,0ab
Milho	7,0ab	22,0ab	48,0abc
Feijão	1,0ab	5,0bcd	22,0bc
Milho	0,0b	1,0cd	25,0bc
Ervilhaca	0,0b	0,0d	6,0c
Aveia	0,0b	0,0d	2,0c
C.V. (%)	84,74	84,09	58,40

Os dados foram transformados em arco seno raiz de  $(x+1)/100$  para análise estatística e teste de médias. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de LSD de Fischer ( $\alpha = 0,05$ ).

Embora não tenha havido diferenças estatísticas na avaliação inicial entre os tratamentos com extrato de aveia e de ervilhaca com extratos de resíduos de outras culturas, a ausência de escleródios com germinação carpogênica nestes tratamentos evidencia seu efeito inibidor. Resultados semelhantes foram encontrados por Gavassoni *et al.* (2006), onde o

efeito supressor na formação de apotécios em escleródios de *S. sclerotiorum* foi observado em tratamentos com extratos de aveia, feijão, ervilhaca e trigo.

Os extratos de resíduos de milho e trigo tiveram nas três avaliações realizadas, porcentagem de germinação carpogênica estatisticamente igual à testemunha. Apenas extratos de aveia e ervilhaca, apresentaram, em todas as épocas de avaliação, efeito significativo na redução da germinação carpogênica nos escleródios de *S. sclerotiorum* utilizados neste ensaio.

Os extratos de feijão e milho apresentaram efeito inibidor nas avaliações iniciais, porém, na última avaliação, houve significativo aumento da germinação carpogênica.

Não houve efeito na supressão e/ou redução na capacidade de emissão de apotécios e número médio de apotécios por escleródios tratados com extratos etanólicos de resíduos das culturas, na primeira avaliação (Quadro 13) deste experimento.

**Quadro 13.** Número de apotécios por escleródio de *S. sclerotiorum* germinados carpogenicamente, sob efeito de diferentes extratos obtidos de resíduos de culturas aos 37 DAI e posteriores avaliações aos 52 e 67 DAI. Dourados/2007.

Tratamento	Apotécios por escleródios (n°)		
	37 dias	52 dias	67 dias
Testemunha	2,0a	3,4a	3,8ab
Trigo	1,6a	2,9ab	4,8ab
Milho	1,1a	2,2ab	4,7ab
Feijão	0,8a	1,3ab	4,3ab
Milho	0,0a	0,8ab	7,0a
Ervilhaca	0,0a	0,0b	0,8b
Aveia	0,0a	0,0b	0,6b
C.V. (%)	43,1	47,6	44,3

Dados transformados em raiz quadrada de  $(x+1)$  para análise estatística e teste de médias.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de LSD de Fischer ( $\alpha = 0,05$ ).

Aos 37 DAI, foi evidenciado o efeito dos extratos de aveia e ervilhaca, na supressão da formação de apotécios.



Na última avaliação (67 DAI) os escleródios advindos dos tratamentos com extratos de milho, trigo, milho e feijão, tiveram números de apotécios formados por escleródios iguais à testemunha.

Em condições favoráveis, se um escleródio germinar carpogenicamente e um apotécio viável se formar, ele poderá produzir até  $2 \times 10^8$  ascósporos durante algumas semanas. Em condições de campo seria interessante a redução do potencial de inoculo de 7,0 apotécios ( $n^\circ$  médio de apotécios formado por escleródio “tratamento com resíduos de milho) para 0,8 e 0,6 ( $n^\circ$  médio de apotécios formado por escleródio “tratamento com ervilhaca e aveia”) aproximadamente 89% e 91% respectivamente, como pode ser observado na quarta coluna do Quadro 13, pois isso implica diretamente na redução do inóculo inicial.

Estudos de Costa (2003) mostraram que a redução do inóculo inicial permitiu a redução no número de pulverizações e maior eficiência no controle da doença em feijão. Segundo o mesmo autor, em solos contendo diferentes densidades de inóculo (escleródios) no solo, o controle adequado da doença só foi obtido nas áreas com menos de 19 escleródios por  $m^2$  de solo. Em áreas com mais de 27 escleródios por  $m^2$ , os fungicidas não foram eficientes no controle da doença. Obviamente, estudos adicionais, em campo, precisam confirmar, o efeito dos resíduos de ervilhaca e aveia detectados em ensaios laboratoriais.

#### **4.4.2 - Avaliação do efeito de fases obtidas da partição dos extratos etanólicos de resíduos de plantas cultivadas sobre a germinação carpogênica de *S. sclerotiorum***

Todos os extratos estudados neste ensaio tiveram efeito com significativa redução na germinação carpogênica em relação à testemunha. Assim como no ensaio com extratos etanólicos, as fases obtidas da partição do extrato etanólico do resíduo de aveia, tais como a aveia acetato de etila (Figura 7A), aveia diclorometano (Figura 7B), aveia hexânica (Figura 7C) e aveia metanol-água (Figura 7D), e as de ervilhaca foram eficientes em reduzir a germinação carpogênica dos escleródios em todas as épocas de avaliação quando comparado com testemunha (Figura 7E).

Os tratamentos com os extratos de milho (fase diclorometano), trigo (fase diclorometano) e feijão (fase hexânica), foram os que apresentaram maior efeito na redução da germinação carpogênica (Quadro 14).

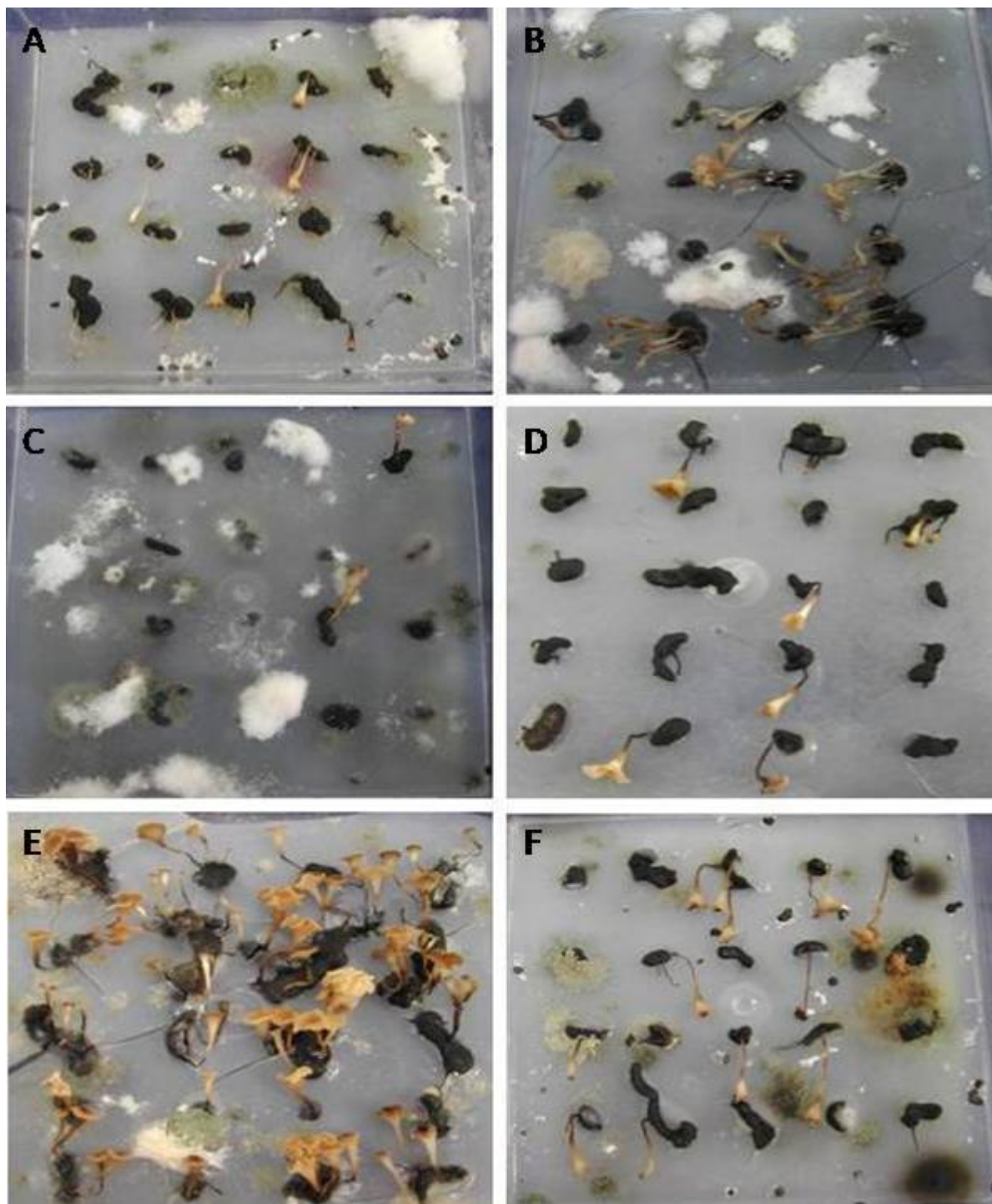


**Quadro 14.** Germinação carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum* sob efeito de diferentes extratos de resíduos de culturas, com diferentes tipos de partições (fases), aos 50 DAI e posteriores avaliações aos 57, 64, 73 e 81 DAI. Dourados/2007.

Tratamento	Germinação carpogênica(%)				
	50 dias	57 dias	64dias	73dias	81dias
Testemunha	27,0a	44,0 a	68,0a	76,0a	84,0a
Aveia diclorometano	13,0b	17,0bc	35,0b	36,0b	41,0b
Aveia metanol-H <sub>2</sub> O	12,0bc	22,0b	27,0bc	30,0bc	34,0bc
Milheto acetato de etila	9,0bc	16,0bc	23,0bc	26,0bc	29,0bc
Milheto hexânica	7,0bc	12,0bcd	18,0cd	18,0bcd	22,0bcd
Ervilhaca acetato de etila	6,0bc	11,0bcd	18,0cd	19,0bcd	20,0bcd
Aveia acetato de etila	6,0bc	8,0bcd	12,0cde	15,0bcde	19,0bcde
Ervilhaca diclorometano	6,0bc	10,0bcd	15,0cde	16,0bcde	19,0bcde
Ervilhaca hexânica	4,0bc	8,0bcd	10,0cde	11,0bcde	12,0cde
Aveia hexânica	3,0cd	6,0cd	10,0cde	10,0bcde	11,0cde
Milheto diclorometano	1,0d	5,0cd	7,0cde	7,0de	7,0cde
Trigo diclorometano	0,0d	0,0d	2,0e	2,0de	2,0de
Feijão hexânica	0,0d	1,0d	1,0e	1,0e	1,0e
C.V. (%)	53,6	57,2	55,5	57,2	61,2

Os dados foram transformados em arco seno raiz de  $(x+1)/100$  para análise estatística e teste de médias. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de LSD de Fischer ( $\alpha = 0,05$ ).

Em todas as épocas de avaliação, pode ser observado que embora os extratos estudados não tenham apresentado supressão ou inibição total da germinação carpogênica, os apotécios eram mal formados. Embora não tenham sido estudadas características morfológicas tais como coloração e tamanho dos apotécios formados, foi observado que apotécios formados em ágar-água diferiam dos emitidos a partir de escleródios expostos aos extratos de resíduos e suas partições.



**FIGURA 7.** Escleródios em ágar-água e extratos fracionados obtidos a partir de diferentes partições de extratos etanólicos de resíduos de culturas. Escleródios com extrato de aveia fase acetato, com germinação carpogênica e miceliogênica (A), escleródios com extrato de aveia fase diclorometano, com germinação miceliogênica e formação de escleródios (B), escleródios com extratos de resíduos de aveia fase hexânica com predominância de germinação miceliogênica (C), escleródios com extratos de resíduos de aveia fase metanol (D), escleródios do tratamento testemunha, aos 81 DAI (E) escleródios do tratamento com extratos de resíduos de milho fase acetato germinados carpogenicamente e com formação de escleródios (F).

#### 4.5 Efeito de diferentes níveis de pH na germinação carpogênica

Na primeira avaliação, sob pH 6,7 (testemunha), 5,3 (extrato etanólico de milho), e 7,0 houve germinação carpogênica (Quadro 15) e sob pH 3,0 e 4,0 houve germinação miceliogênica (Figura 8D). Esses resultados estão de acordo com Litkei e Voros (1984), que encontraram maiores porcentagens de germinação carpogênica em meios com pH's menos ácidos ou alcalinos e predominância (entre 80-84%) de germinação miceliogênica em meios com pH's situados entre 2 e 4.

Germinação miceliogênica e carpogênica, foram observadas de modo concomitante sob extrato etanólico de aveia com pH 5,9 (Figura 8A), ervilhaca com pH 5,9 (Figura 8B), milho com pH 5,3 (Figura 8C), pH 4 (Figura 8E), pH 5 (Figura 8F) e pH 6 (Figura 8G). Resultados semelhantes foram relatados por Litkei e Voros (1984), que indicaram que na faixa de pH entre 5-6, os escleródios avaliados germinaram, sendo a germinação parcialmente com micélios e com apotécios.

Hifas foram visualizadas em unidades experimentais com 100% dos escleródios germinados carpogenicamente. Provavelmente esse crescimento micelial se iniciou a partir da germinação de ascósporos. Em condições naturais tecidos senescentes ou tecidos necrosados fornecem o nutriente necessário para iniciar a infecção ou germinação (Kora *et al*, 2003).

Na terceira e quarta avaliações, o comportamento dos escleródios diante dos tratamentos recebidos foi semelhante as primeiras, apenas se diferenciando pelo incremento na porcentagem de germinação carpogênica e estabilização dos resultados.

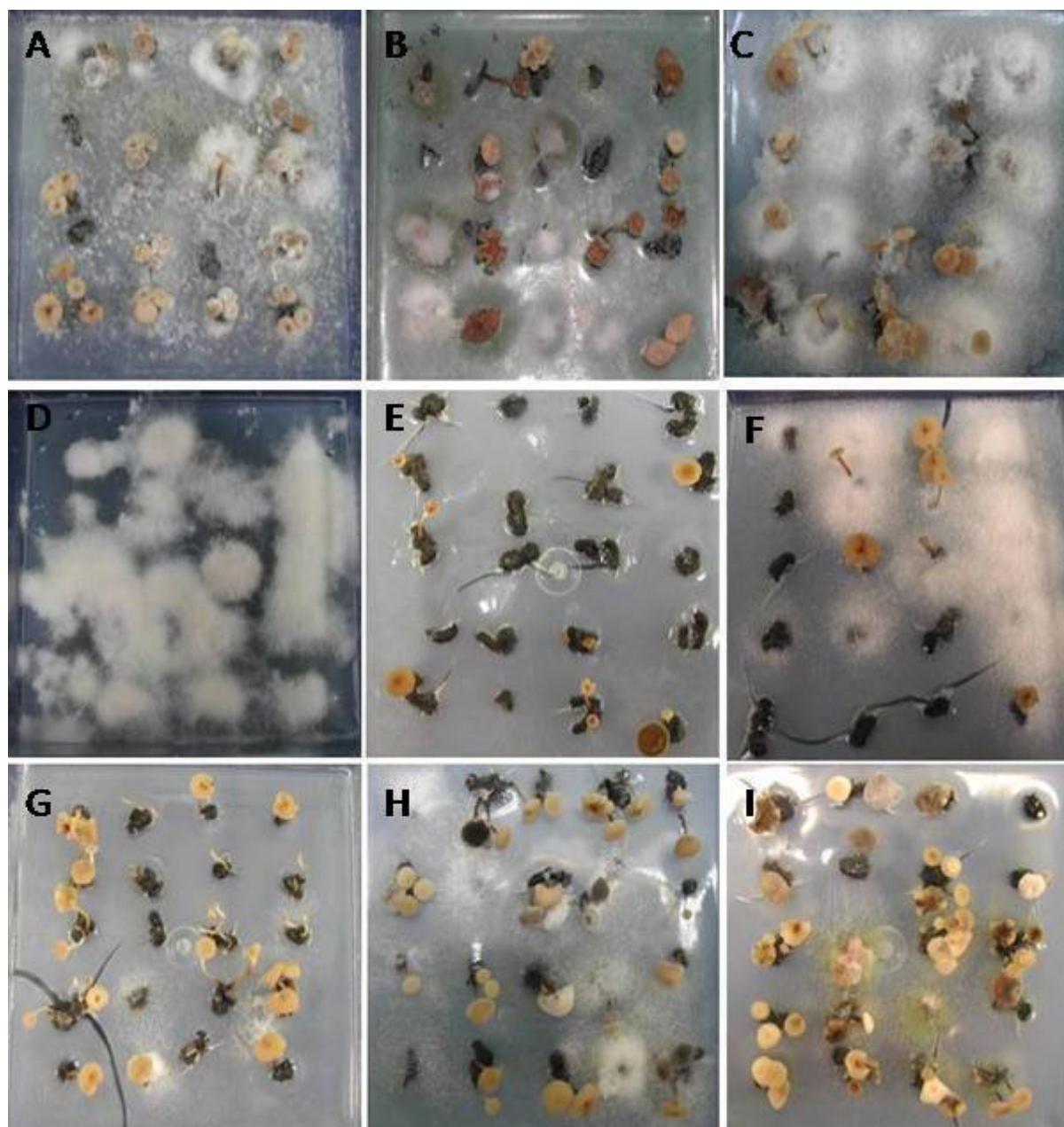
Devido às faixas de pH das soluções de extratos etanólicos de resíduos estudados neste experimento estarem situadas entre 5,2 e 7, verifica-se que o efeito na supressão, observado nesse ensaio, e no ensaio 4.4.1 é decorrente da atividade de algum composto do extrato. Isto se confirma com a ausência do efeito supressor e/ou inibidor dos tratamentos com pH 5,0; 6,0 e 7,0 e da testemunha ( pH 6,7), na porcentagem de germinação carpogênica.

**Quadro 15.** Germinação carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum* sob efeito de sob efeito de extratos etanólicos de aveia, ervilhaca e milho com pH mensurados e diferentes níveis de pH, aos 49 DAI e posteriores avaliações aos 65, 71 e 81 DAI. Dourados/2007.

Tratamento	Germinação carpogênica (%)			
	49dias	65 dias	71 dias	81dias
Testemunha	44,0a	90,0a	91,0a	91,0a
pH 7	17,0b	86,0ab	86,0a	87,0a
pH 6	5,0bc	78,0ab	79,0a	80,0a
pH 5	10,0bc	72,0abc	73,0ab	73,0ab
Aveia (pH 5,9)	8,0bc	54,0bcd	64,0bc	65,0bc
Ervilhaca (pH 5,9)	16,0b	44,0cde	45,0bcd	45,0bcd
Milho (pH 5,3)	22,0b	44,0cde	44,0bcd	44,0bcd
pH 4	11,0bc	33,0de	33,0cd	33,0cd
pH 3	0,0c	9,0e	9,0d	9,0d
C.V. (%)	55,89	41,30	38,48	38,48

Os dados foram transformados em arco seno raiz de  $(x+1)/100$  para análise estatística e teste de médias.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de LSD de Fischer ( $\alpha = 0,05$ ).



**FIGURA 8.** Germinação carpogênica de *S. sclerotiorum* sob diferentes níveis de pH e extratos etanólicos de resíduos de culturas em escleródios em ágar-água. Escleródios em extrato etanólico de aveia (A), escleródios em extrato etanólico de ervilhaca (B), escleródios em extrato etanólico de milho (C), escleródios em pH 3, com germ. miceliogênica (D) escleródios em pH 4 (E), escleródios em pH5 com germinação carpogênica e miceliogênica (F), escleródios em pH 6 (G), escleródios em pH 7 (H) e testemunha, aos 81 DAI (I).

## 5 CONCLUSÕES

Extratos etanólicos da periderme de *Terminalia fagifolia* e das sementes de *Magonia pubescens*, apresentaram efeito supressor na germinação carpogênica dos escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. Extratos etanólicos da periderme de *Tabebuia heptaphylla* e as fases hexânica e CN/CHCl<sub>3</sub> obtidas da partição do extrato etanólico do cerne de *Terminalia fagifolia* tiveram efeito inibidor da germinação carpogênica.

Resíduos de aveia, feijão, ervilhaca e milho em cobertura sobre os escleródios suprimiram a germinação carpogênica mesmo após a sua remoção. Resíduos de milho e trigo proporcionaram efeito inibitório inicial pela ação de barreira física da camada de resíduo. Após a remoção da camada, não houve mais efeito inibitório. Resíduos de milho não tiveram efeito na redução da germinação carpogênica.

Resíduos de culturas submetidos a tratamento térmico favoreceram a germinação miceliogênica.

Extratos etanólicos dos resíduos culturais de aveia e ervilhaca suprimiram a germinação carpogênica. Já os extratos de trigo, feijão milho e milho retardaram a germinação carpogênica.

As fases obtidas da partição com solventes dos extratos etanólicos de resíduos de culturas (aveia, ervilhaca, feijão, trigo e milho), independente da fase de partição, e do resíduo do qual foi extraído, reduziram a germinação carpogênica.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAWI, G.S.; GROGAN, R.G. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v. 69, p. 899–904. 1979.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**, San Diego, Elsevier – Academic Press, p.827. 2005.

ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. F. V.; HENNING, A.; GODOY, C. V.; COSTAMILAN, L. M.; MEYER, M. C. A. Doenças da soja. In: **Manual de Fitopatologia – Doenças das plantas cultivadas**, v. 2. KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. São Paulo, Ceres, p. 569-588. 2005.

AMORIM, L. Sobrevivência do inóculo. In: **Manual de Fitopatologia – Princípios e conceitos básicos**, v. 1. BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. São Paulo, Ceres, p. 246-266. 1995.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: **Manual de Fitopatologia – Doenças das plantas cultivadas**, v. 2. KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. São Paulo, Ceres, p. 333-349. 2005.

BOLAND, G.J. AND HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Can Canadian Journal Plant Pathology**. **16**, 93–108, 1994.

BOLTON, M. D.; THOMMA, P. H. J. B.; NELSON, B. D. Pathogen profile: *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**. v. 7, n. 1, p. 1–16, 2006.

CANTERI, M.G.; PRIA, M.D.; SILVA, O.C. **Principais doenças fúngicas do feijoeiro**, Ponta Grossa - PR, 1ª ed. Editora UEPG. 1999.

CARDOSO, R. M. L.; LEITE, R. M. V. B. C.; BARBOSA, C. J. Doenças da canola. In: **Manual de Fitopatologia – Doenças das plantas cultivadas**, vol. 2. KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. São Paulo, Ceres, p. 197-208. 2005.



CARPINELLA, M. C.; GIORDA, L. M.; FERRAYOLI, C. G.; PALACIOS S M. Antifungal effects of different organic extracts from *Metia azedarach* L. on phytopathogenic fungi and their isolated active components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.51, p. 250-251, 2003.

CARTA, C.; MORETTI, M. D. L.; PEANA, A T. Activity of the oil of *Salvia officinalis* L. against *Botrytis cinerea*. **The Journal of Essential Oil Research**. v. 8, p. 399-404, 1996.

CASSIOLATO, A. M. R. Effects of *Coniothyrium minitans* on carpogenic germination and viability of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 474-476, 1998.

CHARCHAR, M. J. D.; ANJOS, J. R. N.; OSSUPI, E. Ocorrência de nova doença do algodoeiro irrigado no Brasil causada por *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n. 6, p.1101-1106, 1999.

CHATTOPADHYAY, C.; MEEN, P.D.; SUDHERR, K; KUMAR, S. Management of *Sclerotinia* rot of Indian mustard using ecofriendly strategies. **Journal of Mycology and Plant Pathology**, v.32, n. 2, p. 194-200. 2002.

CLARK, C.A. Influence of volatiles from healthy and decaying sweet potato storage roots on sclerotial germination and hyphal growth of *Sclerotinia rolfsii*. **Canadian Journal of Botany**, v. 67, p. 53-57, 1989.

CNPAF, 2004. Disponível em [http://www.cnpaf.embrapa.br//tecnolog/dn\\_mofo.htm](http://www.cnpaf.embrapa.br//tecnolog/dn_mofo.htm)  
Acessado em 17.08.06.

COOK, R, J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plants pathogens**. St Paul: APS Press, 539 p. 1983.

COSTA, G. R.; COSTA, J. L. S. Influência do solo e de substratos para produção de escleródios na germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 36 n. 2, p. 83-87, 2006.

COSTA, J. L. S. Influência da braquiária no manejo de doenças do feijoeiro com origem no solo. In: KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F.; AIDAR, H. (Ed.). **Integração lavoura-pecuária**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, p. 523-538. 2003.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. GC-MS analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, p. 2576-2581, 2000.

DANN, E. K.; DIERS, B. W.; HAMMERSHIMIDT, R. Suppression of *Sclerotinia* stem rot of soybean by lactofen herbicide treatment. **Phytopathology**, v. 89, n. 7, 1999.

DILLARD, H. R.; LUDWIG, J. W.; HUNTER, J. E. Conditioning sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* for carpogenic germination. **Plant Disease**, v. 79, n. 4, p. 411-415, 1995.



FERRAZ, L. C. L., BERGAMIN FILHO, A., AMORIM, L.; NASSER, L. C. B. Efeito da cobertura morta sobre o solo no cultivo de feijoeiro na formação de apotécios de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, suplemento. Ref. 338. Palestras e resumos do XXXIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia. São Pedro, SP. Agosto, 2001.

FERRAZ, L. C. L., BERGAMIN FILHO, A., AMORIM, L.; NASSER, L. C. B. Viabilidade de *Sclerotinia sclerotiorum* após a solarização do solo na presença de cobertura morta. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 017-026, 2003.

FERRAZ, L. C. L.; CAFÉ FILHO, A. C. Meios de cultura e fatores culturais para a produção de escleródios e apotécios de *Sclerotinia sclerotiorum in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 3, p. 364-369, 1998.

FERRAZ, L. C. L.; CAFÉ FILHO, A. C.; NASSER, L. C. B.; AZEVEDO, J. Effects of soil moisture, organic matter and grass mulching on the carpogenic germination of sclerotia and infection of bean by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, v. 48, p. 77-82, 1999.

FRENCH, R. C. Volatile chemical germination stimulators of rust and other fungal spores. **Mycologia** v. 84, p. 277-288, 1992.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; BISOLI, E.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L. Constituintes químicos de escleródios do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. In: 28<sup>a</sup> Reunião da Sociedade Brasileira de Química. 2005, Poços de Caldas, MG. **Anais da 28<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, p.255, 2005.

GAVASSONI, W. L.; SERRA, A. P.; BACCHI, L. M.; OLIVEIRA, M.; CARVALHO, P. M. Influência de extratos vegetais de plantas cultivadas sobre a germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, suplemento. Ref. 804. Palestras e resumos do XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Salvador, Ba. Agosto, 2006.

GRACIA-GARZA, J.A. & BOLAND, G.J. Influence of crop rotation and reduced tillage on white mold of soybean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology** 88:S33. 1998 (Resumo).

HAREL, A.; GOROVITS, R.; YARDEN, O. Changes in protein kinase activity accompany sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**. v. 95, n. 4, p. 397-404. 2005.

HERNANI, L.C. & SALTON, J.C. Manejo e conservação de solos. In: **Milho - Informações Técnicas**. EMBRAPA-CPAO, Dourados - MS, 1997 (Circular Técnica, n° 5)

KORA, C.; McDONALD, M. R.; BOLAND, G. J. Sclerotinia rot of carrot – An example of phenological adaptation and bicyclic development by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 87, n. 5, p. 456-471, 2003.

KULCZYNSKI, L. T.; RADONNSKI, M. I. Atividade fungitóxica de extratos de plantas medicinais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, suplemento. Ref. 195. Palestras e resumos do XXXVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Gramado, RS. Agosto, 2004.

LEITE, B.; SANDER, P. C.; SUGUI, J. A. O papel de compostos voláteis na germinação de esporos fúngicos e na expressão de doenças em plantas. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 21, n. 2, p.109-116, 1995.

LEITE, R. M. V. B. C. Podridão Branca – *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. In: Doenças do girassol. EMBRAPA-CNPSo, Londrina - PR, 1997 (**Circular Técnica**, nº 19).

LEITE, R. M. V. B. C. Doenças do girassol. In: **Manual de Fitopatologia – Doenças das plantas cultivadas**, vol. 2. KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. São Paulo, Ceres, p. 385-400. 2005.

LEITE, R. M. V. B. C.; OLIVEIRA, M. F.; VIEIRA, O. V.; CASTIGLIONI, V. B. R. Incidência da podridão branca causada por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol semeado após a colheita da safra de verão, no Estado do Paraná. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 81-84, 2000.

LeTORNEAU, D. Morphology, cytology, and physiology of *Sclerotinia* species in culture. **Phytopathology** 69: 887-890. 1979.

LITKEI & VOROS *Novenyvedelemi* 20: 49-52. Abstract in: **Review of Plant Pathology** v. 63, p.208. 1984.

LOBO JUNIOR, M.; ABREU, M. S. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 521-526, 2000.

LOBO JUNIOR, M. Cultivo do Feijão Irrigado na Região Noroeste de Minas Gerais, em Doenças e métodos de controle. Embrapa Arroz e feijão - **Sistemas de Produção**, n.5 ISSN 1679-8869 Versão eletrônica Dezembro/2005.

LOBO JR, M.; LOPES, C.A; SILVA, W.L.C. Efeito de seis anos de rotação de culturas sobre a intensidade da podridão-de-esclerotínia em tomateiro para processamento industrial. In: XXXI CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, Fortaleza, 1998. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, supl., 1998. p. 253 (Resumo).

LUMSDEN, R. D. Histology and physiology of pathogenesis in plant diseases caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**. v.69, p. 890-895, 1979.

MASIREVIC, S. GULYA, T. J. *Sclerotinia* and *Phomopsis* - two devastating sunflower pathogens. **Field Crops Research**, 30: 271- 300, 1992.

MELO, R. A.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L. Restos culturais e germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.

29, suplemento. Ref. 370. Palestras e resumos do XXXVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Gramado, RS. Agosto, 2004.

MELLO, A. F. S.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. In the “*in vitro*” inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Scientia Agricola**. Piracicaba, v.62, n.2, p.179-183, Mar./Apr. 2005.

MENEZES, J. R. Controle integrado de doenças em culturas irrigadas por pivô central. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p.270–1, 1995.

MÜLLER-RIEBAU, F.; BERGER, B.; YEGEN, O. Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 43, 2262-2266, 1995.

PARISI, 2004. Mofa Branco ou Murcha de Esclerotínia – *Sclerotinia sclerotiorum*. Disponível em: <http://www.fazendeiro.com.br/GuiaProd/> Acesso em 08.10.06.

PHILLIPS, A.J.L. Carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*: a review. **Phytophylactica** 19:279-283. 1987.

PITAROKILI, D.; TZAKOU, O.; KALAMARAKIS, A. Activity of the essential oil of *Salvia pomifera* L. ssp *calycina* (Sm.) Hayek against soil some pathogens. The Journal of Essential Oil Research. 14, 72-75. 2002.

PITAROKILI, D.; TZAKOU, O.; LOUKIS, A.; HARVALA, C. Volatile metabolites from *Salvia fruticosa* as antifungal agents in soilborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51. 3294-3301. 2003.

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

PURKAYASTHA, R. P. Progress in phytoalexin research during the past 50 years. In: DANIEL, M.; PURKAYASTHA, R. P. (Ed.) Handbook of phytoalexin metabolism e action. New york: Marcel Dekker. p. 1-39. 1995.

RADKE, V. L. Effects of herbicides on carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 63 p.19-23, 1986.

REIS, E. M. A “podridão da haste” da soja. **Lavoura arrozeira**, Porto Alegre, v. 28, n. 287, p. 32-36, 1975.

ROCHA, R, P.; DALLA PRIA, M.; LANG, M. Manejo de *Sclerotinia sclerotiorum* na cultura do alface. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31 (suplemento). Ref. 108. Palestras e resumos do XXXIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Salvador, BA. Agosto, 2006.

SCHURT, D. A.; SILVA JR, G. J.; SHINGRA, O. D. Efeito de óleo essencial de mostarda (*Brassica rapa*) sobre a viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fitopatologia**

**Brasileira**, Brasília, v. 31 (suplemento). Ref. 670. Palestras e resumos do XXXIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Salvador, BA. Agosto, 2006.

SCHWINGEL, M. E. Influência de resíduos de *Brachiaria* sp. sobre a germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Trabalho de conclusão de curso**. 2006, 15 f. Licenciatura em Ciências Biológicas/UEMS. Dourados, MS.

SHARMA. B.K.; BASANDRAI, AK. Effect of biocontrol agents, fungicides and plant extracts on sclerotial viability of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Indian Journal of Agricultural Sciences**. 67: 3, p.132-133, 1997.

SIMM, E.; GAVASSONI, W. L.; BACCHI, L. M. A. Efeito de resíduos culturais sobre a germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, (suplemento). Ref. 804. Palestras e resumos do XXXIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia. São Pedro, S.P. Agosto, 2001.

STANGARLIN, J.R.; G. FRANZENER.; PASCHOLATI, S.F. Doenças da ervilha. In: **Manual de Fitopatologia** – Doenças das plantas cultivadas, vol. 2. KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. São Paulo, Ceres, p. 311-318. 2005.

STEADMAN, J.R. Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, 69, 904–907. 1979.

STEFANELLO, J.; SCHWINGEL, M. E.; GARCEZ, F.; GARCEZ, W.; GAVASSONI, W. L. Sobrevivência e potencial de inóculo de *Sclerotinia sclerotiorum* influenciados por extratos vegetais de plantas do cerrado. **Anais do EIC VII Encontro de iniciação científica da UFMS**. Campo Grande, MS. Outubro, 2006.

SUN, P.; YANG, X. B. Light, temperature, and moisture effects on apothecium production of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 84, n. 12, p. 1287-1293, 2000.

VIEIRA, R. F., PAULA JÚNIOR, T. J. de, PERES, A. P.; MACHADO, J. da C. Fungicidas aplicados via água de irrigação no controle do mofo-branco no feijoeiro e incidência do patógeno na semente. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 770-773, 2001.

ZAMBONELLI, A; ZECHINI D'AULERIO, A; BIANCHI, A; ALBASINI, A. Effects of essential oils on phytopatogenic fungi in vitro. **Journal Phytopathologica**. 144, 494-494, 1996.