



**FERNANDO PEREIRA MONTEIRO**

**INTERFERÊNCIA DE PLANTAS DE  
COBERTURA NO COMPORTAMENTO DE  
*Sclerotinia sclerotiorum***

**LAVRAS – MG  
2010**

**FERNANDO PEREIRA MONTEIRO**

**INTERFERÊNCIA DE PLANTAS DE COBERTURA NO  
COMPORTAMENTO DE *Sclerotinia sclerotiorum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador  
Dr. Paulo Estevão de Souza

Co-Orientador  
Dr. Mário Sobral de Abreu

**LAVRAS – MG  
2010**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Monteiro, Fernando Pereira.

Interferência de plantas de cobertura no comportamento de  
*Sclerotinia sclerotiorum* / Fernando Pereira Monteiro. – Lavras :  
UFLA, 2010.

93 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Paulo Estevão de Souza.

Bibliografia.

1. Mofo branco. 2. Extratos vegetais. 3. Exsudatos radiculares. 4.  
Escleródio. 5. Apotécio. I. Universidade Federal de Lavras. II.  
Título.

CDD – 632.4

**FERNANDO PEREIRA MONTEIRO**

**INTERFERÊNCIA DE PLANTAS DE COBERTURA NO  
COMPORTAMENTO DE *Sclerotinia sclerotiorum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 22 de setembro de 2010.

Dr. Mário Sobral de Abreu UFLA

Dr. Élberis Pereira Botrel EPAMIG

Dr. Paulo Estevão de Souza  
Orientador

Co-Orientador  
Dr. Mário Sobral de Abreu

**LAVRAS - MG  
2010**

*Ao meu amigo e avô, Orlando.*

**OFEREÇO**

*A minha família, em especial, meu avô Orlando, meu pai Freddy e meu tio Rolando.*

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP), pela colaboração na realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da UFLA, pelos conhecimentos transmitidos.

Ao professor Dr. Mário Sobral de Abreu, pela co-orientação, paciência, amizade, dedicação e seus ensinamentos que foram de grande importância para a realização deste trabalho e minha formação profissional.

Ao professor Dr. Paulo Estevão de Souza, pela orientação e esclarecimentos prestados.

Aos amigos pós-graduandos, pelo companheirismo e suporte, nos momentos em que precisei.

Ao amigo Leandro Pereira Pacheco, pelas experiências compartilhadas ao longo dos anos.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, pelo auxílio e a todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, meu muito obrigado!

## RESUMO GERAL

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é um importante patógeno devido ao dano que causa a diversas plantas, entre elas, culturas de interesse comercial. É considerado um organismo necrotrófico com grande permanência no ambiente em que se instala, devido à formação de estruturas de resistência, conhecida como escleródio. A forma de dispersão mais eficiente do fungo recebe o nome de germinação carpogênica, na qual há a produção de apotécios que abrigam os esporos do fungo, chamados de ascósporos. Medidas de controle têm sido aplicadas de maneira integrada para conter o avanço do patógeno, porém, há aspectos que a literatura não elucidada, como o tipo de espécie vegetal presente no campo infestado. Desse modo, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de esclarecer quais os efeitos promovidos pelas plantas de cobertura *Crotalaria juncea*, *Brachiaria ruziziensis*, *Panicum maximum* cv. Mombaça, *Pennisetum glaucum*, *Cajanus cajan* e *Stylosanthes* sp. Neste trabalho, foram avaliados a interferência direta, o efeito dos extratos e dos exsudatos radiculares dessas plantas sobre diversas fases do ciclo de vida do patógeno e, ainda, o comportamento dos escleródios em diferentes substratos. Como resultado, os extratos das plantas se comportaram de maneira diferente quanto ao crescimento micelial, à germinação micelial e carpogênica dos escleródios e à germinação de ascósporos, neste último caso, quando uma população microbiana estava presente. Os exsudatos radiculares das plantas diferiram estatisticamente apenas nas concentrações de 1 e 10% para o crescimento micelial. Quanto à germinação carpogênica, os exsudatos radiculares diferiram estatisticamente apenas para o número de apotécios germinados após 52 dias. Para a germinação dos ascósporos, os exsudatos das plantas estilósantes e feijão tiveram efeito indireto, impedindo a germinação quando uma população microbiana estava presente. A indução da germinação carpogênica obteve valores estatísticos iguais para o ambiente com ágar-água e mistura solo e areia.

Palavras-chave: Manejo cultural. *Sclerotinia sclerotiorum*. Plantas de cobertura.

## GENERAL ABSTRACT

The fungus *Sclerotinia sclerotiorum* is an important pathogen due to damage in several plants, among them economically important crops. It is considered a necrotrophic organism with great stay in the environment in which it installs due the formation resistance structures, known as sclerotia. The most efficient way of spreading the fungus is called carpogenic germination, in which there is the production of apothecia that harbor the spores call of ascospores. Control measures have been implemented in an integrated way to contain the spread of the pathogen, but there are aspects of that literature does not elucidate, as the type of plant species present in the infested field. Thus, the present study was aimed to clarify which effects caused by the cover plants *Crotalaria juncea*, *Brachiaria ruziziensis*, *Panicum maximum* cv. Mombasa, *Pennisetum glaucum*, *Cajanus cajan* and *Stylosanthes* sp . This study evaluated the direct interference, the effect of extracts and root exudates of these plants on various phases of the life cycle of the pathogen, and yet the behavior of sclerotia in different substrates. As a result, the plant extracts behaved differently mycelial growth, mycelial and carpogenic germination of sclerotia and ascospore germination in the latter case, when a microbial population was present. The root exudates of plants differed significantly only at concentrations of 1 and 10% for mycelial growth. As for the carpogenic germination exudates differed significantly only for the number of apothecia germinated after 52 days. For germination of ascospores the exudates of *Cajanus cajan* and *Stylosanthes* sp. had indirect effect by preventing the germination when a microbial population was present. The induction of carpogenic germination obtained statistical values for the substrate with agar-water, soil and sand mixture.

Keywords: Management culture. *Sclerotinia sclerotiorum*. Cover crops.



## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b> Introdução geral.....	11
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
<b>2.1</b>	<b>Influência das plantas de cobertura na supressão sobre escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> no solo</b> .....	14
<b>2.2</b>	<b>Extratos de plantas de cobertura no desenvolvimento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i></b> .....	20
<b>2.3</b>	<b>Exsudatos radiculares de plantas de cobertura na germinação micelial e carpogênica de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i></b> .....	22
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	26
	<b>CAPÍTULO 2</b> Resíduos de plantas de cobertura na supressividade sobre os escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e diferentes substratos para germinação carpogênica.....	37
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	39
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
<b>2.1</b>	<b>Produção dos escleródios</b> .....	41
<b>2.2</b>	<b>Influência direta das plantas de cobertura sobre a germinação micelial dos escleródios</b> .....	41
<b>2.3</b>	<b>Taxa de recuperação dos escleródios</b> .....	42
<b>2.4</b>	<b>Índice da velocidade do crescimento micelial</b> .....	43
<b>2.5</b>	<b>Germinação carpogênica em diferentes substratos</b> .....	43
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	45
<b>3.1</b>	<b>Influência direta das plantas de cobertura sobre a germinação micelial dos escleródios</b> .....	45
<b>3.2</b>	<b>Taxa de recuperação dos escleródios acondicionados no solo</b> .....	45
<b>3.3</b>	<b>Índice da velocidade do crescimento micelial</b> .....	48
<b>3.4</b>	<b>Germinação carpogênica em diferentes substratos</b> .....	50
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	53

	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	54
	<b>CAPÍTULO 3 Extratos vegetais de plantas de cobertura no desenvolvimento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>.....</b>	58
1	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	60
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	62
2.1	<b>Obtenção dos extratos das plantas de cobertura.....</b>	62
2.2	<b>Extratos sobre o crescimento micelial.....</b>	63
2.3	<b>Extratos na germinação micelial e carpogênica dos escleródios.....</b>	63
2.4	<b>Extratos vegetais na germinação dos ascósporos.....</b>	64
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	66
3.1	<b>Influência do extrato vegetal no crescimento micelial.....</b>	66
3.2	<b>Influência do extrato das plantas de cobertura na germinação micelial do escleródio.....</b>	67
3.3	<b>Influência do extrato vegetal sobre a germinação de apotécio.....</b>	69
3.4	<b>Influência do extrato vegetal sobre o número de escleródios germinados carpogenicamente.....</b>	70
3.5	<b>Porcentagem de germinação dos ascósporos, em função dos extratos das plantas de cobertura com e sem a adição de streptomicina.....</b>	71
4	<b>CONCLUSÕES.....</b>	74
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	75
	<b>CAPÍTULO 4 Exsudatos radiculares de plantas de cobertura no desenvolvimento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>.....</b>	78
1	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	80
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	83
2.1	<b>Obtenção dos exsudatos radiculares das plantas de cobertura.....</b>	83
2.2	<b>Influência dos exsudatos radiculares sobre o crescimento micelial.....</b>	84
2.3	<b>Influência dos exsudatos radiculares na germinação micelial e carpogênica dos escleródios.....</b>	85

2.4	Influência dos exsudatos radiculares sobre a germinação dos ascósporos.....	85
3	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	87
3.1	Influência dos exsudatos radiculares no crescimento micelial.....	87
3.2	Influência dos exsudatos radiculares das plantas de cobertura na germinação micelial dos escleródios.....	88
3.3	Influência dos exsudatos radiculares das plantas de cobertura no número de apotécios germinados.....	89
3.4	Influência dos exsudatos radiculares das plantas de cobertura no número de ascósporos germinados carpogenicamente.....	90
3.5	Influência dos exsudatos radiculares das plantas de cobertura no número de ascósporos germinados.....	90
4	CONCLUSÕES.....	93
	REFERÊNCIAS.....	94

## CAPÍTULO 1

### Introdução geral

### 1 INTRODUÇÃO

*Sclerotinia sclerotiorum* foi descrito, pela primeira vez, por Bary, em 1884 (PURDY, 1979) e está incluído na Família Sclerotiniaceae, da Ordem Helotiales, Filo Ascomycota, Reino Fungi (AGRIOS, 2005).

O fungo é patogênico a 48 famílias, 278 gêneros e 408 espécies de plantas (BOLAND; RALL, 1994), entre as quais, espécies economicamente importantes, como soja, feijão, batata, tomate, ervilha, alface, chicória, repolho, couve-flor, cenoura e outras (PAVAN; KRAUSE-SAKATE; KUROZAWA, 2005). Além do mais, plantas daninhas também foram citadas como hospedeiras do patógeno por Homechin (1982), tais como amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L.), picão-preto (*Bidens pilosa* L.), caruru (*Amaranthus deflexus* L.), erva-queente (*Borreria alata* Aubl.), guanxuma (*Sida rhombifolia* L.), corda-de-viola (*Ipomoea nil* L. Roth), maria-mole (*Senecio brasiliensis* Less.) e fazendeiro (*Galinsoga parviflora* Cav.).

As áreas agrícolas com incidência do patógeno têm aumentado significativamente, sendo a produção agrícola extremamente afetada em alguns casos. Segundo relatos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA (2007), as perdas no rendimento atingem, em média, 50% e podem atingir níveis mais elevados em alguns casos. Ricardo, Wander e Lobo Júnior (2008) estimaram o dano econômico causado por essa doença em 36 milhões de reais na terceira safra de feijão, em 2007, no estado de Goiás.

Em pesquisas tem sido relatado que esse patógeno apresenta uma fase de seu ciclo de vida no solo (CAFÉ FILHO, 1985), o que tem dificultado o seu

controle em diversas culturas, em razão de o fungo apresentar a capacidade de formar estruturas de resistência conhecidas como escleródios (COLEY-SMITH; COOKE, 1971).

Em vários trabalhos foi demonstrado que pode haver escleródios remanescentes, mesmo utilizando várias táticas de controle, que seriam suficientes para originar o processo doença (HUANG et al., 2000; MUELLER; HARTMAN; PEDERSEN, 1999).

O uso do manejo integrado de doenças consiste na associação de várias ferramentas de controle, que pode auxiliar na redução da população de *Sclerotinia sclerotiorum* no solo (BENNETT; LEIFERT; WHIPPS, 2003).

Ao considerar o elevado custo e a baixa eficiência no controle desse patógeno, o manejo químico não tem sido recomendado como a única forma de controle (PAULA JÚNIOR; VIEIRA; ZAMBOLIM, 2004). O uso de práticas fitotécnicas, como semeadura menos adensada, rotação de culturas e, sobretudo, uso de plantas de cobertura, que possam promover efeito supressor na população de doenças, pode auxiliar no manejo integrado.

As plantas de cobertura promovem a cobertura do solo, bem como a liberação de compostos antagonistas a determinados grupos de microrganismos patogênicos no solo (ASMUS et al., 2005). A ação de compostos orgânicos na redução de doenças causadas por patógenos de solo é conhecida e vários adubos verdes, resíduos culturais e outros resíduos orgânicos são utilizados na busca desse efeito (HOITINK; MADDEN; BOEHM, 1996). Esses resíduos são convertidos em compostos orgânicos via mineralização biológica e, além de seu efeito benéfico nas características físicas e químicas do solo, podem induzir supressividade e atuar no controle de doenças causadas por patógenos de solo (HOITINK; BOEHM, 1991).

Os escleródios podem ser disseminados sobre a superfície do solo pelo vento, por percolação de água e durante a colheita. O uso de plantas de cobertura

que promovam elevada cobertura do solo pode auxiliar na redução da disseminação, em razão do menor arraste de solo e estruturas do patógeno pelo vento. Além do mais, o elevado crescimento de raízes dessas espécies contribui para a formação de matéria orgânica, maior aeração e infiltração de água no solo.

O uso de plantas de coberturas, aliado ao sistema de plantio direto, pode auxiliar no controle de *S. sclerotiorum*. Isso se dá em razão de os escleródios também serem distribuídos dentro do perfil do solo devido ao seu revolvimento (SCHWARTZ; STEADMAN, 1978).

Para ampliar as opções dos agricultores no manejo da doença é necessário o estudo de novas medidas de controle, entre elas, a utilização de espécies de plantas de cobertura no processo produtivo e capazes de produzir metabólitos antifúngicos que atuem na inibição do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Desse modo, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de esclarecer quais os efeitos promovidos pelas plantas de cobertura *Crotalaria juncea*, *Brachiaria ruziziensis*, *Panicum maximum* cv. Mombaça, *Pennisetum glaucum*, *Cajanus cajan* e *Stylosanthes* sp.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Influência das plantas de cobertura na supressão sobre escleródios no solo

O processo de germinação dos escleródios e a formação do corpo de frutificação de *S. sclerotiorum*, conhecido como apotécio, são determinantes para a expressão da doença e o processo epidêmico. Cada escleródio pode germinar carpogenicamente, produzindo de um a vários apotécios que liberam milhares de ascósporos (KOHN, 1979). O apotécio tem formato de taça, com coloração branca, amarela ou marrom e pode medir até 130 mm de comprimento (BARDIN; HUANG, 2001). Segundo Schwartz e Steadman (1978), a produção de apotécio pode ser influenciada pela profundidade do escleródio no solo, pela presença de cobertura vegetal e de substâncias químicas e pelo tempo de cultivo do solo.

A supressividade é uma característica desejável do solo, pois possibilita o controle de doenças com maior eficiência e, por consequência, ameniza os danos ambientais, uma vez que nenhuma prática nociva é aplicada. O reconhecimento dos solos supressivos estimulou uma nova busca por mecanismos de controle natural de doenças, principalmente quando a resistência do hospedeiro ou o tratamento químico são inviáveis (POZZER; CARDOSO, 1990). Os fatores que determinam a supressividade devem ser estudados visando à utilização dessas informações na indução da supressividade em solos conducentes.

Interações complexas entre fatores abióticos e bióticos do solo podem conduzir à supressividade, motivo pelo qual propriedades do solo, como textura, tipo de argila, teores de fósforo (P), potássio (K), carbono (C), nitrogênio (N), alumínio (Al), cálcio (Ca), magnésio (Mg), sódio (Na) e matéria orgânica (MO),

relação carbono/nitrogênio (C/N), condutividade elétrica, ponto hidrogeniônico (pH), densidade, biomassa e atividade microbiana, dentre outras, podem ser utilizadas como indicadoras da supressividade (HORNBY, 1983).

O estudo desses fatores, principalmente os relacionados com o solo, é de grande relevância, uma vez que aproximadamente 90% do ciclo de vida de *Sclerotinia* spp. ocorre no solo (ADAMS; AYERS, 1979). Chitarra (2007) ressalta que o fungo pode sobreviver como parasita de outros hospedeiros, de forma saprofítica em restos culturais ou utilizar a matéria orgânica disponível no solo.

Nos solos supressivos, segundo Baker e Cook (1974), a população do patógeno ou não se estabelece ou se estabelece, mas não produz doença, ou se estabelece e causa doença por um determinado período, porém, sofre um declínio com o tempo. A supressividade de um determinado solo é, geralmente, detectada pela presença de uma menor população de patógenos em relação a outro com características opostas ou, ainda, pela presença de uma população predominante (HORNBY, 1983). A variação na incidência das doenças é estudada há algum tempo, sendo reconhecido o uso de solos supressivos como mais uma alternativa no manejo de doenças causadas por fungos que sobrevivem saprofiticamente (SCHNEIDER, 1982).

A presença de determinadas plantas na área pode promover ou dificultar a sobrevivência do patógeno. Sabe-se que a palhada densa de *Brachiaria* sp. representa uma das principais medidas utilizadas no controle da doença, por reduzir a formação dos apotécios (OLIVEIRA, 2005). A incidência da podridão de sclerotinia na alface e a sobrevivência dos escleródios de *S. sclerotiorum* foram reduzidas pela adição de resíduos orgânicos ao solo (ASIRIFI; MORGAN; PARBERY, 1994).

As plantas de cobertura são excelentes fornecedoras de nutrientes às culturas sucessoras, graças ao elevado acúmulo dos nutrientes na matéria seca e



às suas altas taxas de mineralização (BOER et al., 2007; TORRES; PEREIRA; FABIAN, 2008). Braz et al. (2004) verificaram que o milheto, a braquiária e o capim-mombaça têm a capacidade de acumular grande quantidade de nutrientes, que são liberados no solo após a morte da planta, e a influência destes em relação ao desenvolvimento de *Sclerotinia sclerotiorum* deve ser estudada.

A incorporação de matéria orgânica ao solo via plantas de cobertura pode melhorar as características físicas e químicas, aumentar a atividade e a microbiota, sobretudo aqueles antagonistas a fitopatógenos (BAPTISTA et al., 2007; FENILE; SOUZA, 1999). Guini, Schoenmaker e Bettiol (2002) relatam que a qualidade da matéria orgânica é fundamental na indução da supressividade do solo a *Pythium*.

No trabalho de Toledo-Souza et al. (2008), a análise conjunta das safras mostrou interações significativas entre safras, sistemas de plantio e culturas prévias sobre a população de *Fusarium* spp. De modo geral, foram encontradas maiores populações sob o sistema plantio direto, com exceção do cultivo pré-safra com *B. brizantha*, nas safras 2003 e 2005, em que a população foi maior no plantio convencional. Segundo Costa e Rava (2003), há redução da fonte de inóculo de alguns patógenos de solo e tendência de obtenção de maiores rendimentos de feijão, quando as braquiárias são utilizadas como fonte de cobertura morta no plantio direto. A sucessão ou a rotação com *Brachiaria* sp. é uma boa alternativa para se viabilizar a continuidade deste sistema em áreas afetadas por patógenos de solo, uma vez que os resultados mostraram tendência de menor número de propágulos com uso desta prática.

Costa e Rava (2003) observaram, no sistema plantio direto, que, ao longo das safras, aumentos sucessivos ocorreram na população de *Fusarium*, com o cultivo de *Crotalaria spectabilis*, *Cajanus cajan* e *Pennisetum glaucum* para fornecimento de palha. No plantio convencional, aumentos no inóculo ocorreram nos cultivos prévios de *C. spectabilis* e *C. cajan*. Isso mostra que

resíduos de leguminosas favoreceram o aumento da população de *Fusarium* spp., independentemente do sistema de cultivo. Os mesmos autores relatam, ainda, que o sistema plantio direto favorece o aumento da população de *Rhizoctonia* spp., devido ao aumento da densidade no solo.

Segundo Machado et al. (2004), as características físicas e químicas do solo podem influenciar na sobrevivência do inóculo de *Fusarium oxysporum*, acelerando ou retardando o desenvolvimento da doença pela alteração da viabilidade do inóculo. Para patógenos como *Sclerotinia sclerotiorum*, que têm estruturas de resistência, a viabilidade do inóculo é um parâmetro extremamente importante, por permitir a sua sobrevivência em condições adversas. Sendo assim, práticas que inviabilizam sua sobrevivência são relevantes para prevenir prejuízos na lavoura.

Costa e Rava (2003), em áreas sob sistema plantio direto contendo diferentes densidades de inóculo do fungo no solo, demonstraram que a eficiência de controle do mofo-branco com o uso de fungicidas correlacionou-se positivamente com o número de escleródios presentes no solo. A aração de solo com arado de aiveca, em profundidades variando de 22 a 37 cm, é uma medida que obteve sucesso com o enterrio de escleródios, reduzindo em até nove vezes a densidade de inóculo inicial. No entanto, essa prática não é eficiente, visto que os escleródios enterrados voltam à superfície com a preparação do solo para a próxima safra.

Em ensaios realizados por Kluthcouski, Stone e Aidar (2003) foi obtido sucesso na supressão de *S. sclerotiorum* com a utilização da palhada de milho e *Brachiaria brizantha*. Em todos esses estudos, as palhadas foram eficientes em permitir a redução do inóculo, fazendo com que afluíssem à superfície do solo e, por conseguinte, permitindo a redução no número de pulverizações com fungicidas.

Costa (2003) verificou que a incorporação de certas palhadas, como a do arroz e do milho, favoreceu o desenvolvimento de podridões radiculares do feijoeiro. A palhada de *Brachiaria* sp. reduziu a incidência dessas doenças em 60% e os restos culturais de milho não influenciaram. Kluthcouski et al. (2003) relataram que a palhada de soja certamente favorece a proliferação de *Sclerotinia sclerotiorum* por ser uma boa hospedeira do fungo.

Aidar e Ferreira (1996) conduziram um estudo em área com elevada presença *Sclerotinia sclerotiorum* no solo, no qual palhadas de *Brachiaria* sp. foram as que melhor contiveram a progressão da doença no feijoeiro. A utilização da palha de aveia e polipropileno preto reduziu a podridão incitada por *Sclerotinia sclerotiorum*, na estação de verão (ROCHA, 2007). Ambrósio et al. (2008) trabalharam com mandioca, brócolis, eucalipto e mamona integrados com a solarização e os resultados mostraram que essas plantas têm potencial no controle de fungos de solo (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotium rolfsii*). Hao, Subbarao e Koike (2003) verificaram que resíduos de brócolis (*Brassica oleracea* var. *itálica*) diminuiram a viabilidade de escleródios de *S. minor* no solo por conterem compostos prejudiciais ao desenvolvimento do fungo, tais como os glucosinolatos.

A fitomassa de quinoa (*Chenopodium quinoa*), também conhecida como chenopoa, reduz a viabilidade de *S. sclerotiorum*. Algumas cultivares podem apresentar alta concentração de saponinas, substâncias tóxicas que podem atuar na inativação dos escleródios. Dubey et al. (1983) demonstraram efeito positivo para a palhada de *Chenopodium* spp. no controle de *Rhizoctonia solani*.

O uso de *Penissetum glaucum* BN2, *Crotalaria spectabilis* e *Cajanus cajan* em sistema plantio direto aumentou a população de *Fusarium* spp. O mesmo ocorreu no preparo convencional, quando precedido por *Crotalaria spectabilis*, *Cajanus cajan* e *Sytosanthes guianensis*, tendo o cultivo prévio da

última espécie relatada apresentado a maior população de *Fusarium* spp. Os autores observaram, ainda, comportamento semelhante, em relação, às leguminosas, para *Rhizoctonia solani* (TOLEDO-SOUZA et al., 2008).

Ferraz et al. (1999) relataram que a germinação carpogênica aumentou em solo com alto teor de matéria orgânica. No entanto, vários autores relatam que altos níveis de matéria orgânica reduzem a incidência da doença ou germinação carpogênica de *S. sclerotiorum* (ASIRIFI; MORGAN; PARBERY, 1994; MINEEV; DURYINA, 1992; SINGH; SINGH; SHAHI, 1991).

A viabilidade dos escleródios também foi estudada por Bueno, Ambrósio e Souza (2007), que utilizaram o meio neon, desenvolvido por Nasser, Boland e Sutton (1995), o qual muda da cor azul para a amarela, em função da produção de ácido oxálico pelo escleródio viável. Os autores constataram que, mesmo sendo enterrados por até seis meses no campo, ainda permaneceram viáveis.

Segundo Purdy e Grogan (1954), o crescimento e a formação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* ocorreram quando os macronutrientes inorgânicos, como fósforo, magnésio e enxofre estavam presentes no meio. A omissão de Zn de um meio líquido de glicose e sais (com pH inicial de 4,1-4,3, em cultura estacionária) resultou na diminuição do peso seco dos escleródios e três dos quatro isolados de *Whetzelinia sclerotiorum* (*Sclerotinia sclerotiorum*), não produziram escleródios sem adição de Zn (VEJA; TOURNEAU, 1974).

Budge e Whipps (1991) relatam que o número e o peso fresco total de escleródios produzidos por um isolado de *Sclerotinia sclerotiorum* aumentaram linearmente com a concentração de sacarose. Alexander e Stewart (1994) relataram que a porcentagem de recuperação dos escleródios foi reduzida significativamente após 11 meses em solos de horticultura, e que o número de escleródios declina rapidamente no solo contido em caixas, após três meses.

Dessa forma, as plantas de cobertura em sistema plantio direto devem ser estudadas quanto à supressão de *Sclerotinia sclerotiorum* para criar alternativas no manejo da doença em áreas infestadas pelo patógeno.

## **2.2 Extratos de plantas de cobertura no desenvolvimento de *Sclerotinia sclerotiorum***

Extratos de diferentes plantas têm sido estudados no controle de fitopatógenos. Segundo Sonaglio et al. (2003), extratos são todos os produtos obtidos a partir de matéria-prima vegetal que podem ser liberados ao solo, via decomposição pelos microrganismos do solo. Essas substâncias podem ser extraídas por distintas metodologias por meio do emprego de soluções extrativas, comumente preparadas em meio aquoso, etanoico, hidroetanoico ou oleosos, com o objetivo de retirar determinados compostos da planta.

Carneiro et al. (2007) avaliaram o efeito positivo do extrato de sementes e extratos de folhas de nim no controle do oídio do feijoeiro. Rodrigues et al. (2006) verificaram que o extrato bruto aquoso de eucalipto (*Corymbia citriodora*) reduziu *in vitro* o crescimento micelial e a produção de esporos do fungo *Helminthosporium* sp. coletado nas fibras do pseudocaule da bananeira. *In vivo*, as fibras de bananeira tratadas preventivamente com o extrato aquoso bruto de eucalipto não foram afetadas pelo fungo. Ferracini, Melo e Frigheto (1990) trabalharam com extratos de ambrósia (*Chenopodium ambrosioides* L.), *Cimaba cedron* P., aruba (*Simarouba amara* Aubl.), quássia (*Quassia* spp.), *Pterocaulon balansae* e cinamomo (*Melia azedarach* L.) e verificaram que estes inibiam, *in vitro*, os fungos *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii*.

Souza, Araújo e Nascimento (2007) trabalharam com extratos de alho (*Allium sativum* L.) e capim-santo (*Cymbopogon citratus* Stapf.), visando o

controle de *Fusarium proliferatum* e observaram que eles reduziram a taxa de crescimento micelial e a germinação dos esporos, bem como a incidência em grãos de milho. Rodrigues et al. (2007) verificaram a eficiência do extrato bruto aquoso de gengibre (*Zingiber officinalis*) no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em alface, em razão da ação antimicrobiana, por meio da inibição do crescimento micelial e produção de escleródios. Balbi-Peña et al. (2006) verificaram que os extratos de *Curcuma longa* e curcumina apresentaram níveis de controle semelhante ao oxiclreto de cobre no controle de *Alternaria solani*, quando aplicados em plantas de tomateiro.

Marques et al. (2002) observaram que não houve efeito fungitóxico do extrato de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) sobre os fungos *Botrytis cineria*, *Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum*. Ho et al. (2007) avaliaram o efeito de extratos de diversas plantas medicinais na germinação dos esporos de *Alternaria brassicicola*, e os resultados mostram a possibilidade de se desenvolver métodos para o controle das doenças de plantas. Por outro lado, alguns extratos podem estimular o desenvolvimento do patógeno. Leandro et al. (2003) verificaram que extratos oriundos de flores de morango podem aumentar o número de conídios de *Colletotrichum acutatum* nas folhas.

Segundo Lenné e Brown (1991), bactérias isoladas do filoplano de *Stylosanthes guianensis*, particularmente *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp., inibiram o crescimento micelial em ágar e a germinação de conídios de isolados patogênicos e isolados patogênicos fracos de *Colletotrichum gloeosporioides*. Os mesmos autores ressaltam, ainda, que a atividade antagonista dessa bactéria pode ser relacionada com a produção de antibiótico.

As plantas de estilosas são recobertas por tricomas, ou pelos, que secretam um fluido viscoso. Esses tricomas são reconhecidos como defensores contra insetos que se alimentam de plantas. Essas plantas apresentam também papel reconhecido contra carrapatos, principalmente em áreas onde o estiloso

é encontrado (SUTHERST; JONES; SCHNITZERLING, 1982; ZIMMERMAN; GARRIS; BEAVER, 1984).

Huang (1985) afirma que a germinação miceliogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* está associada com o grau de melanização da parede celular da casca. Devido ao desenvolvimento incompleto da casca, pode haver germinação mais rápida com a produção de micélio. Por outro lado, a completa formação impede a imediata germinação de escleródios na falta de nutrientes fornecidos exogenamente, o que promove a dormência. Esse depósito de melanina também foi observado por Abdullah, Ali e Suleman (2008), ao utilizarem microscopia eletrônica de transmissão para estudar o desenvolvimento do escleródio, ressaltando, ainda, que essa melanização pode tornar a destruição dos escleródios mais difícil.

O estudo de novos extratos torna-se importante para a descoberta de novas formas de controle do patógeno, bem como obter uma melhor compreensão acerca de plantas que podem atuar na supressividade ao patógeno.

### **2.3 Exsudatos radiculares de plantas de cobertura na germinação micelial e carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum***

O sistema radicular, além da função de sustentação, absorção de água e nutrientes, é capaz de liberar substâncias denominadas exsudatos radiculares. Hawes e Brigham (1992) apresentam possíveis mecanismos para melhor compreender a interação entre os exsudatos e microrganismos. De acordo com esses autores, os efeitos ligados à promoção da colonização podem ser classificados como diretos e indiretos. Os efeitos diretos são: atração para a rizosfera; indução de genes envolvidos em associações planta-microrganismo; supressão de genes de microrganismos para dormência; provisão de nutrientes para o crescimento dos microrganismos e os efeitos indiretos: aumento da

disponibilidade de nutrientes para as plantas, mineralização; estimulação de microrganismos mutualistas; suporte estrutural para o crescimento das colônias; mudanças no ambiente químico, ponto hidrogeniônico (pH) e inibição de organismos competitivos.

Para a inibição da colonização, os efeitos diretos podem ser repulsão da rizosfera, supressão de genes microbianos requeridos para a associação planta-microrganismo, indução de genes e de microrganismos para dormência e toxicidade/antibiose. Os efeitos indiretos podem ser imobilização de microrganismos pela atração por células do bordo, competição por nutrientes entre células do bordo e microrganismos, mudanças estruturais que diminuem a mobilidade, mudanças no ambiente químico, quelação de minerais e estimulação do crescimento de microrganismos antagonistas.

A superfície da raiz, sobretudo os 20 mm da região apical, é recoberta por um material gelatinoso de alto peso molecular, denominado mucilagem. A mucilagem é secretada, ou liberada passivamente, pelas células da epiderme da raiz ou pelas células da coifa e é constituída, principalmente, por polissacarídeos e ácidos poligalacturônicos (VERMEER; MCCULLY, 1981). As raízes também liberam grande variedade de compostos orgânicos solúveis, de baixo peso molecular. Os principais constituintes dessa fração são os glucídeos, os ácidos orgânicos, constituídos por aminoácidos e compostos fenólicos. A proporção e a composição desses compostos variam consideravelmente em função da espécie da planta, das condições fisiológicas, de impedimentos mecânicos ao crescimento da raiz e de vários tipos de estresse (JONES; DARRAH, 1993).

Rodrigues et al. (2001) trabalharam com diversos híbridos de sorgo e verificaram que plantas com menor crescimento radicular produziram maior quantidade de sorgoleone. Esse composto apresenta efeito inibitório do crescimento, em raízes e na parte aérea de espécies vegetais cultivadas e daninhas. Quando um hospedeiro suscetível está presente, os exsudatos



radiculares estimulam a germinação dos esporos e o micélio do fungo cresce em direção à raiz, seguindo o gradiente de exsudatos radiculares. Campos, Campos e Coimbra (2006) observaram redução da penetração e formação de fêmeas adultas de *Meloidogyne javanica* em soja quando o exsudato foi vertido no substrato de crescimento da plântula suscetível de soja.

Segundo Nelson (1990), muitos fungos fitopatogênicos sobrevivem no solo em estado quiescente. Para que as interações patógeno-raiz se iniciem, os propágulos dormentes precisam ser ativados por moléculas presentes em exsudatos de sementes e raízes. Portanto, essas substâncias são os estímulos primários para a promoção da germinação de propágulos de alguns fungos habitantes do solo, tais como *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. A germinação de seus microconídios ocorre em resposta a exudatos de origem desconhecida das raízes de *Musa* sp. Escleródios de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* são estimulados por compostos voláteis desconhecidos oriundos de sementes de ervilha.

Propágulos de quase todos os gêneros de fitopatógenos habitantes do solo respondem aos exsudatos das sementes e raízes. Todavia, pouco se conhece sobre as moléculas específicas que elicitam essas respostas (BOWEN; ROVIRA, 1991). Hasse, May-De-Mio e Lima Neto (2007) avaliaram o efeito do pré-plantio com plantas medicinais e aromáticas no controle de *Plasmodiophora brassicae* e atribuíram o efeito supressivo do solo à concentração de exsudatos radiculares.

Diz, Carvalho e Gomes (2003) relataram que plantas exsudam substâncias através da superfície de raízes e na germinação de sementes. Alguns desses compostos, entre os quais proteínas transportadoras de lipídeos constituídas de peptídeos básicos de 9 kDA ricos em cisteína, parecem ter uma ação inibitória contra certos patógenos e têm a função de proteção de plantas contra infecções microbianas.

São encontrados, na literatura, relatos de inibição de *Pseudomonas solanacearum*, *Clavibacter michiganensis*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma viride* e *Cercospora beticola* (CARVALHO et al., 2001; KADER, 1996; MOLINA; SEGURA; GRACIA-OLMEDO, 1993; TERRAS et al., 1992). Algumas outras proteínas antimicrobianas também têm sido encontradas em exsudatos a partir de sementes de *Zea mays* (DUVICK et al., 1992), *Mirabilis jalapa* (CAMMUE et al., 1992) e *Amaranthus caudatus* (BROEKAERT et al., 1997).

A necessidade de se verificar a existência de substâncias exsudadas pelas plantas e antagonicas ao patógeno é justificada por proporcionar melhor compreensão do ambiente no qual o patógeno está inserido.

## REFERÊNCIAS

ABDULLAH, M. T.; ALI, N. Y.; SULEMAN, P. Effect of salinity, temperature and carbon source on the growth and development of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* isolated from semi-arid environment. **Plant Pathology Journal**, Oxford, v. 24, n. 4, p. 407-416, Jan. 2008.

ADAMS, P. B.; AYERS, W. A. Ecology of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, Palo Alto, v. 69, n. 8, p. 896-899, Aug. 1979.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. New York: Academic, 2005. 922 p.

AIDAR, H.; FERREIRA, P. R. C. Apresentação. In: REUNIÃO NACIONAL DE PRESUIVA DE FEIJÃO, 5., 1996, Goiânia. **Anais...** Goiânia: EMBRAPA Arroz e Feijão, 1996. p. 2-3.

ALEXANDER, B. J. R.; STEWART, A. Survival of sclerotia of *Sclerotinia* and *Sclerotium* spp in New Zealand horticultural soil. **Soil Biology and Biochemistry**, San Diego, v. 26, n. 10, p. 1323-1329, Oct. 1994.

AMBRÓSIO, M. M. Q. et al. Controle de fitopatógenos do solo com materiais vegetais associados à solarização. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 4, p. 354-358, dez. 2008.

ASIRIFI, K. N.; MORGAN, W. C.; PARBERY, D. G. Supression of Sclerotinia soft rot of lettuce with organic soil amendments. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v. 34, n. 1, p. 131-136, Dec. 1994.

ASMUS, G. L. et al. Reação de algumas culturas de coberturas utilizadas no sistema plantio direto a *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 47-52, jun. 2005.

BAKER, R.; COOK, J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: Freeman, 1974. 433 p.

BALBI-PEÑA, M. I. et al. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina: avaliação *in vivo*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 401-404, jun. 2006.

BAPTISTA, M. J. et al. Eficiência da solarização e biofumigação do solo no controle da murcha-bacteriana do tomateiro no campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 7, p. 933-938, jun. 2007.

BARDIN, S. D.; HUANG, H. C. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 23, n. 1, p. 88-98, Mar. 2001.

BENNETT, J. A.; LEIFERT, C.; WHIPPS, J. M. Survival of the biocontrol agents *Coniothyrium minitans* and *Bacillus subtilis* MBI 600 introduced into pasteurised sterilised and non-sterile soils. **Soil Biology and Biochemistry**, San Diego, v. 35, n. 12, p. 1565-2573, Dec. 2003.

BOER, C. A. et al. Ciclagem de nutrientes por plantas de cobertura na entressafra em um solo de cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 9, p. 1269-1276, set. 2007.

BOLAND, G. J.; RALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 16, n. 2, p. 93-108, June 1994.

BOWEN, G. D.; ROVIRA, A. D. The rhizosphere: the rhizosphere, the hidden half of the hidden half. In: WAISEL, Y.; ESHAL, A.; KAFKAT, U. **Plant roots: the hidden half**. New York: M. Dekker, 1991. p. 641-669.

BRAZ, A. J. B. P. et al. Acumulação de nutrientes em folha de milho e dos capins braquiária e mombaça. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 34, n. 2, p. 83-87, maio/ago. 2004.

BROEKAERT, W. F. et al. Antimicrobial peptides from plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, London, v. 16, n. 3, p. 297-323, May/June 1997.

BUDGE, S. P.; WHIPPS, J. M. Effect of sucrose concentration on sclerotia production and subsequent apothecial formation by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, n. 2, p. 195-198, Feb. 1991.

BUENO, C. J.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; SOUZA, N. L. Produção e avaliação da sobrevivência de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 47-55, mar. 2007.

CAFÉ FILHO, A. C. Alerta aos produtores de ervilha podridão-de-sclerotinia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 3, n. 2, p. 57-58, jan./mar. 1985.

CAMMUE, B. P. A. et al. Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 267, n. 4, p. 2228-2233, Feb. 1992.

CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P.; COIBRA, J. L. Efeito de exsudatos radicular de *Brachiaria decubens* e do sorgoleone de *Sorghum bicolor* no desenvolvimento de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 59-65, abr. 2006.

CARNEIRO, S. M. T. P. G. et al. Eficácia de extratos de nim para o controle do oídio do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 34-39, mar. 2007.

CARVALHO, A. O. et al. Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 39, n. 2, p. 137-146, Feb. 2001.

CHITARRA, L. G. **Mofo branco em algodoeiro**. Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2007. 3 p. (Comunicado Técnico, 336).

COLEY-SMITH, J. R.; COOKE, R. C. Survival and germination of fungal sclerotia. **Annual Review of Phytopathology**, Davis, v. 9, p. 65-92, Sept. 1971.

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

COSTA, J. L. da S.; RAVA, C. A. Influência da braquiária no manejo de doenças do feijoeiro com origem no solo. In: KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F.; AIDAR, H. **Integração lavoura-pecuária**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2003. p. 523-533.

DIZ, M. S. S.; CARVALHO, A. O.; GOMES, V. M. Purification and molecular mass determination of a lipid transfer protein exuded from *Vigna unguiculata* seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes, v. 15, n. 3, p. 171-175, Dec. 2003.

DUBEY, N. K. et al. Fungitoxicity of some higher plants against *Rhizoctonia solani*. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 72, n. 1, p. 91-94, Jan./May 1983.

DUVICK, J. P. et al. Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 267, n. 3, p. 18814-18820, Dec. 1992.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Pragas e doenças do feijão**. Santo Antônio de Goiás, 2007. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/feijao/pragasedoenças/index.htm>>. Acesso em: 10 nov. 2007.

FENILE, R. C.; SOUSA, N. L. Efeitos de materiais orgânicos e da umidade do solo na patogenicidade de *Rhizoctonia solani* Kühn GA-4 HGI ao feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 11, p. 1959-1967, nov. 1999.

FERRACINI, V. L.; MELO, I. S.; FRIGHETO, R. T. S. Influência de *Chenopodium ambrosioides* L. no crescimento micelial e germinação de escleródios de *Sclerotium rolfii*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 2, p. 176-181, mar./abr. 1990.

FERRAZ, L. C. L. et al. Effects of soil moisture, organic matter and Grass mulching on the carpogenic germination of sclerotia and infection of bean by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 48, n. 1, p. 77-82, Feb. 1999.

GUINI, R.; SCHOENMAKER, I. A. S.; BETTIOL, W. Solarização do solo e incorporação de fontes de material orgânica no controle de *Pythium* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 9, p. 1253-1261, set. 2002.

HAO, J.; SUBBARAO, K. V.; KOIKE, T. Effects of broccoli rotation on *Lettuce* drop caused by *sclerotinia minor* and on the population density of sclerotia in soil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, n. 2, p. 159-166, Feb. 2003.

HASSE, I.; MAY-DE-MIO, L. L.; LIMA NETO, V. da C. Efeito do pré-plantio com plantas medicinais e aromáticas no controle de *Plasmodiophora brassicae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 74-79, mar. 2007.

HAWES, M. C.; BRIGHAM, L. A. Impact of root border cells on microbial populations in the rhizosphere. **Advances in Plant Pathology**, London, v. 8, n. 4, p. 119-148, Dec. 1992.

HO, W. C. et al. Effect of oriental medicinal plant extracts on spore germination of *Alternaria brassicicola* and nature of inhibitory substances from speedweed. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, n. 12, p. 1621-1624, Dec. 2007.

HOITINK, H. A. J.; BOEHM, M. J. Interactions between organic matter decomposition level, biocontrol agents and plant pathogens in soil-borne disease. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 4., 1991, Campinas. **Anais...** Campinas: Emopi, 1991. p. 63-77.

HOITINK, H. A. J.; MADDEN, L. V.; BOEHM, M. J. Relationships among organic matter decomposition level, microbial species diversity, and soilborne disease severity. In: HALL, R. **Principles and practice of managing soilborne plant pathogens**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1996. p. 237-249.

HOMECHIN, M. **Tentativa de estabelecimento do fungo *Trichoderma* sp., para verificacao do seu potencial antagonistico, sobre o fungo *Sclerotinia sclerotiorum***: resultado de pesquisa. Londrina: EMPBRAPA Soja, 1982. 217 p.

HORNBY, D. Suppressive soils. **Annual Review of Phytopathology**, Davis, v. 21, p. 65-85, Sept. 1983.

HUANG, H. C. Factors affecting myceliogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, Palo Alto, v. 75, n. 4, p. 433-437, Apr. 1985.

HUANG, H. C. et al. Foliar application of fungal biocontrol agents for the control of white mold of dry bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**, San Diego, v. 18, n. 3, p. 270-276, July 2000.

JONES, D. L.; DARRAH, P. R. Re-absorption of organic compounds by roots of *Zea mays* L. and its consequences in the rizosphere: II., experimental and model evidence for simultaneous exudation and re-absorption of soluble C compounds. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 153, n. 1, p. 47-59, June 1993.

KADER, J. C. Lipid-transfer protein in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 627-654, June 1996.

- KLUTHCOUSKI, J. et al. **Cultivo do feijoeiro em palhada de braquiária.** Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2003. 28 p. (Documentos, 157).
- KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F.; AIDAR, H. **Integração lavoura-pecuária.** Santo Antonio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2003. 570 p.
- KOHN, L. M. Delimitation of the economically important plant pathogenic *Sclerotinia species*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 881-886, Aug. 1979.
- LEANDRO, L. F. S. et al. Strawberry plant extracts stimulate secondary conidiation by *Colletotrichum acutatum* on symptomless leaves. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 10, p. 1285-1291, Oct. 2003.
- LENNÉ, J. M.; BROWN, A. E. Factors influencing the germination of pathogenic and weakly pathogenic isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* on leaf surfaces of *Stylosanthes guianensis*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, n. 2, p. 227-232, Feb. 1991.
- MACHADO, A. L. M. et al. Caracterização de solos do Agreste de Pernambuco quanto a supressividade à murcha-de-fusário do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 2, p. 271-276, abr./jun. 2004.
- MARQUES, M. C. S. et al. Efeito fungitóxico dos extratos de *Caryocar brasiliense* Camb. sobre os fungos *Botrytis cineria*, *Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1410-1419, nov./dez. 2002.
- MINEEV, V. G.; DURYINA, E. P. Soil-agrochemical aspects of sunflower resistance to white rot: causal organism *Sclerotinia sclerotiorum*. **Agrokhimiya**, Moscow, v. 12, n. 1, p. 57-67, Jan. 1992.
- MOLINA, A.; SEGURA, A.; GARCIA-OLMEDO, F. Lipid transfer proteins (nsLTP) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. **Federation European Biochemical Societies Letters**, Heidelberg, v. 316, n. 2, p. 119-122, Jan. 1993.
- MUELLER, D. S.; HARTMAN, G. L.; PEDERSEN, W. L. Development of sclerotia and apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* from infected soybean seed and its control by fungicide seed treatment. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, n. 12, p. 1113-1115, Dec. 1999.



NASSER, L. C. B.; BOLAND, G. J.; SUTTON, J. C. Meio de cultura semi-seletivo para detecção da viabilidade dos escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 376-377, ago. 1995. Suplemento.

NELSON, E. B. Exudate molecules initiating fungal responses to seeds and roots. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 129, n. 1, p. 61-73, Dec. 1990.

OLIVEIRA, S. H. F. Manejo do mofo branco. **DBO Agrotecnologia**, São Paulo, v. 2, n. 4, p. 1-4, maio/jun. 2005.

PAULA JÚNIOR, T. J.; VIEIRA, R. F.; ZAMBOLIM, L. Manejo integrado de doenças do feijoeiro em plantio direto. In: ZAMBOLIM, L.; SILVA, A. A.; AGNES, E. L. **Integração agricultura-pecuária**. Viçosa, MG: UFV, 2004. p. 11-44.

PAVAN, M. A.; KRAUSE-SAKATE, R.; KUROSZAWA, C. Doenças da alface. In: KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 27-33.

POZZER, L.; CARDOSO, J. E. Supressividade natural de um latossolo vermelho escuro a *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 3, p. 206-210, maio/jun. 1990.

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

PURDY, L. H.; GROGAN, R. G. Physiological studies of *Sclerotinia sclerotiorum* in liquid and agar culture. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 44, n. 1, p. 36-38, Jan. 1954.

RICARDO, T. R.; WANDER, A. E.; LOBO JÚNIOR, M. Custos associados ao mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em feijoeiro comum de 3º safra em Goiás. In: CONGRESSO NACIONAL DE FEIJÃO, 10., 2008, Campinas. **Anais...** Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas, 2008. p. 78-79.

ROCHA, R. P. **Manejo da podridão de Sclerotinia e míldio (*Bremia lactucae*) na cultura de alface**. 2007. 95 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2007.

RODRIGUES, E. et al. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e eucalipto *in vitro* e em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium sp.* **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 123-127, jan./mar. 2006.

\_\_\_\_\_. Fungitoxicidade atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 2, p. 124-128, abr./jun. 2007.

RODRIGUES, J. C. et al. Determinação do conteúdo de sorgoleona nos exsudatos radiculares de híbridos de sorgo. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 48, n. 2, p. 49-54, jan./fev. 2001.

SCHNEIDER, R. W. **Suppressive soils and plant disease**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1982. 88 p.

SCHWARTZ, H. F.; STEADMAN, J. R. Factors affecting sclerotium populations and apothecium production of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 68, n. 3, p. 383-388, Mar. 1978.

SINGH, U. P.; SINGH, K. P.; SHAHI, D. K. Carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in some soil samples differing in physico-chemical properties. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 24, n. 2, p. 241-243, Apr. 1991.

SONAGLIO, D. et al. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2003. p. 289-326.

SOUZA, A. E. F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L. C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 465-471, dez. 2007.

SUTHERST, R. W.; JONES, R. J.; SCHNITZERLING, H. J. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. **Nature**, London, v. 295, n. 28, p. 320-321, Jan. 1982.

TERRAS, F. R. G. et al. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 267, n. 22, p. 15301-15309, Aug. 1992.

TOLEDO-SOUZA, E. D. et al. Sistemas de cultivo, sucessões de culturas, densidade do solo e sobrevivência de patógenos de solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 8, p. 971-978, ago. 2008.

TORRES, J. L. R.; PEREIRA, M. G.; FABIAN, A. J. Produção de fitomassa por plantas de cobertura e mineralização de seus resíduos em plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 3, p. 421-428, mar. 2008.

VEGA, R. R.; TOURNEAU, L. D. The effect of zinc on growth and sclerotial formantion in *Whetzelinia sclerotiorum*. **Mycologia**, New York, v. 66, n. 2, p. 256-264, Mar./Apr. 1974.

VERMEER, J.; MCCULLY, M. E. Fucose in the surface deposits of axenic and field grown roots of *Zea mays* L. **Protoplasma**, Karlsruhe, v. 109, n. 3/4, p. 233-248, Sept. 1981.

ZIMMERMAN, R. H.; GARRIS, G. I.; BEAVER, J. S. Potential of *Stylosanthes* plants as a component in an integrated pest management approach to tick control. **Preventive Veterinary Medicine**, Fort Collins, v. 2, n. 1/4, p. 579-588, Mar. 1984.

## CAPÍTULO 2

### **Resíduos de plantas de cobertura na supressividade sobre os escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* e diferentes substratos para a germinação carpogênica**

#### **RESUMO**

As plantas de cobertura promovem melhorias na fertilidade do solo. Todavia, essas plantas também podem influenciar as populações de microrganismos, dentre eles os fitopatógenos. Com isso, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a influência de diferentes plantas de cobertura sobre a taxa de recuperação dos escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* no solo, bem como sua influência no crescimento. As plantas de cobertura utilizadas no experimento foram crotalária, capim-braquiária, capim-mombaça, milho, feijão-guandu-anão e estilosantes. Os substratos utilizados para a germinação carpogênica foram ágar-água, ágar-água+papel filtro, areia e mistura areia e solo. Quanto à taxa de recuperação dos escleródios, estilosantes e mombaça apresentaram as menores taxas. A testemunha e a braquiária apresentaram as maiores taxas de recuperação dos escleródios. Quanto ao índice da velocidade de crescimento micelial, o estilosantes obteve a menor taxa de crescimento, seguido por milho, braquiária, mombaça, crotalária, feijão-guandu-anão e testemunha solo. A testemunha armazenada em tubo obteve a maior taxa de crescimento. Para a germinação carpogênica em diferentes substratos, a areia obteve o menor valor. Na formação de apotécios, os substratos ágar e mistura solo-areia produziram as maiores quantidades. A germinação carpogênica em ágar-água mostra que a presença de nutrientes não é fator vital para a formação de apotécios.

Palavras-chave: Plantas de cobertura. Manejo cultural. Controle biológico.

## ABSTRACT

The cover crops promote improvements in soil fertility. However, these plants may also influence the populations of microorganisms, among them, the plant pathogens. Thus the aim of this study was to evaluate the influence of different cover crops on the rate of recovery of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil, as well as its influence on mycelial growth. The cover crops used in the experiment were showy crotalaria, grass brachiaria, grass mombaça, millet, pigeon pea beans and stylosanthes. The substrates used for germination carpogenic were water-agar, agar-water filter paper, sand, sand and soil mixture. As the recovery rate of sclerotia, and the stylosanthes, panicum grass cv. mombaça had the lowest rates. The witness and Brachiaria had the highest percentage recovery of sclerotia. As for the content of mycelial growth rates of the stylosanthes had the lowest rate of growth followed by millet, brachiaria, mombaça grass, showy crotalaria, pigeon pea dwarf and soil control. The witness stored in a tube obtained the highest growth rate. For carpogenic germination in different substrates sand had the lowest value. In the formation of apothecia agar and soil-sand mixture produced the highest amount. The carpogenic germination in the agar-water shows that the presence of nutrients is not vital for the formation of apothecia.

Keywords: Cover crops. Cultural management. Biological control.

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas de cobertura do solo apresentam potencialidades para promover melhorias nas propriedades químicas, físicas e biológicas do solo (DEBIASI et al., 2010; MACHADO; ASSIS, 2010; TOLEDO-SOUZA et al., 2008). A população microbiológica do solo apresenta grande importância em estudos fitopatológicos, uma vez que o manejo pode modificar a relação entre aqueles considerados benéficos e maléficos ao crescimento das plantas (MARSCHENER et al., 2001; PEREIRA; NEVES; DROZDOWICZ, 1999). Cada espécie de planta comporta-se de maneira diferente quanto a esse estímulo, possibilitado pela liberação de exsudatos radiculares durante o desenvolvimento da planta e a liberação de nutrientes pela mineralização de seus tecidos (CARDOSO; FREITAS, 1992; ROCHA; CAMPOS; SOUZA, 2004).

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* de tem se destacado como importante fitopatógeno em diversas culturas, entre elas soja, feijão, girassol e algodão (CHARCHAR; ANJOS; OSSUPI, 1997; HOFFMAN; HARTMAN; MUELLER, 1998; NASSER et al., 1999). Além das culturas comerciais, esse fungo sobrevive no solo por longo período de tempo, em razão da estrutura de resistência chamada escleródio. Algumas plantas daninhas são consideradas multiplicadoras desse fungo, o que tem dificultado o manejo dessa doença (VALARINI; SPADOTTO, 1995).

Na tentativa de controlar o avanço dessa doença em território brasileiro, várias medidas de controle têm sido empregadas, como o emprego de fungicida, rotação de cultura e aplicação de organismos antagonistas. Oliveira (2005) relata que os fungicidas mais indicados para o controle do mofo branco são o procimidone, o fluazinam e o vinclozolin, e, em situações de menor pressão de inóculo benzimidazóis, tiofanato metílico e carbendazim podem ser utilizados. Kluthcouski et al. (2003) relataram o uso de palhada densa de braquiária, como

uma das principais ferramentas no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*. Moretini e Melo (2007) produziram uma formulação à base do fungo *Coniothyrium minitans* para controle do mofo-branco.

Embora existam extensos trabalhos elucidando as características do fungo, há muitos fatores pendentes de comprovação científica, sendo apenas citado como fator influente. Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de conhecer a influência de diferentes plantas de cobertura sobre a taxa de recuperação de escleródio, o comportamento dos escleródios em meio batata-água-dextrose após um período de 45 dias sobre o solo e a exigência de nutrientes para a germinação caporgênica.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi composto de sete tratamentos, em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, instalado em Lavras, MG, localizada nas coordenadas 21°14'43" latitude sul, 44° 59'59" longitude oeste e altitude de 919 m. O experimento foi conduzido de janeiro a julho de 2010. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e, quando significativo pelo teste F, as médias foram comparadas pelo teste estatístico, por meio da ferramenta Sisvar.

### **2.1 Produção de escleródios**

A obtenção dos escleródios para utilização no experimento foi induzida de maneira artificial. Para isso, foi colocado um escleródio, oriundo de lavouras atacadas por mofo-branco sediadas na região de Rio Verde, GO, no centro cada placa de Petri vertida com meio BDA. Essa placa foi acondicionada em câmara de crescimento BOD, a 20°C, com fotoperíodo de 12 horas, por 20 dias. Após a produção dos primeiros escleródios, discos de micélio provenientes desta placa foram transferidos para outras placas contendo o meio BDA para induzir a produção de mais escleródios, sendo esse procedimento repetido sucessivas vezes, até que atingisse a quantidade necessária de escleródios.

### **2.2 Influência direta das plantas de cobertura sobre a germinação micelial dos escleródios**

Os tratamentos foram compostos pelas seguintes espécies de plantas de cobertura: crotalária (*Crotalaria juncea* L.), braquiária (*Brachiaria ruziziensis*), capim-mombaça (*Panicum maximum* cv. Mombaça), milho ADR 300



(*Pennisetum glaucum*), feijão-guandu-anão (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) e estilosantes (*Stylosanthes capitata* x *Stylosanthes macrocephala*), além de testemunha sem a presença de plantas de cobertura, cada uma com 4 repetições. A unidade experimental utilizada foram caixas plásticas Gerbox preenchidas com solo, onde foram semeadas as plantas de cobertura. À testemunha foi adicionado apenas o solo, para simular a ausência das espécies estudadas. Esse solo utilizado foi um Latossolo Vermelho-Escuro coletado aleatoriamente em vários pontos para garantir a representatividade da amostra. Após a coleta do solo, este foi peneirado e esterilizado conforme a metodologia desenvolvida por Menezes e Silva-Hanlin (1997).

Após esses procedimentos, os tratamentos (caixas plásticas Gerbox contendo solo com suas respectivas plantas de cobertura semeadas e testemunha) foram acondicionados em câmaras de crescimento, à temperatura de 20°C e fotoperíodo de 12 horas. Após 40 dias, as plantas foram ceifadas e dispostas sobre a superfície do solo. Após esse procedimento, foram adicionados nove escleródios a uma profundidade de 0,5 cm, dispostos de forma equidistante e, em seguida, acondicionados na câmara de crescimento por mais 40 dias. Durante todo o experimento, o solo foi irrigado para manter a umidade próxima à capacidade de campo. Procedeu-se à instalação de nebulizadores para manter a umidade relativa do ar acima de 60%, a fim de favorecer a germinação dos escleródios. Os escleródios foram observados quanto à existência de germinação micelial até duas semanas após a alocação dos escleródios.

### **2.3 Taxa de recuperação dos escleródios**

Após acondicionar os escleródios por quarenta dias, de maneira similar ao procedimento adotado no tópico anterior, foi avaliada a taxa de recuperação dos escleródios. Foi feita uma relação entre os escleródios recuperados em cada

tratamento, em relação ao número de escleródios alocados inicialmente em contato com as plantas de cobertura.

#### **2.4 Índice da velocidade do crescimento micelial**

Utilizando-se os escleródios recuperados no experimento anterior foi aferido o crescimento micelial radial diário e, posteriormente, calculado o índice da velocidade do crescimento micelial (IVCM) pela fórmula desenvolvida por Salgado et al. (2003). Nesse procedimento, os escleródios que ficaram em contato com as plantas de cobertura foram desinfestados utilizando-se procedimento padrão (imersos por 30 segundo no álcool a 70%, em seguida imersos no hipoclorito de sódio a 2%, por 2 minutos, seguindo-se 3 lavagens sucessivas em água destilada e esterilizada). Após essa operação, foram postos individualmente em placas de Petri contendo meio BDA e foram acondicionados em câmara de crescimento com temperatura de 20°C e fotoperíodo de 12 horas. Cada tratamento tinha quatro repetições. Além da testemunha, escleródios provenientes do solo sem as plantas de cobertura, também foi aferido o crescimento de escleródios armazenados em tubos tipo falcon, à temperatura ambiente.

#### **2.5 Germinação carpogênica em diferentes substratos**

Foi avaliada a germinação de escleródios em placas de Petri contendo ágar-água (2%), ágar-água (2%)+papel filtro, areia e caixas plásticas Gerbox contendo solo e areia na proporção de 1:1. Todos os tratamentos foram molhados apenas uma vez, tendo a quantidade de água nas placas de Petri sido de 15 ml e, para o solo, a umidade mantida próximo à capacidade de campo. Os tratamentos foram armazenados em câmara de crescimento com temperatura de

20°C e fotoperíodo de 12 horas. A avaliação do número de escleródios germinados e apotécios formados foi realizada após 32 dias.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Influência direta das plantas de cobertura sobre a germinação micelial dos escleródios**

Para este estudo não houve influência direta das coberturas vegetais sobre a germinação micelial dos escleródios. Os valores obtidos foram iguais a zero. Atribuiu-se esse resultado à pouca cobertura vegetal disponível no ambiente em função dos resultados posteriores obtidos nesta dissertação, ou seja, há a existência de substâncias indutoras, no entanto, a quantidade liberada pela decomposição do material vegetal não é suficiente para induzir a germinação micelial. Acredita-se que, ao utilizar maior quantidade de material vegetal como cobertura morta, esse resultado podem ser confirmado.

#### **3.2 Taxa de recuperação dos escleródios acondicionados no solo**

Os resultados da taxa de recuperação dos escleródios no solo estão apresentados na Tabela 1. Houve diferença estatística entre os tratamentos, tendo os escleródios alocados sob a palhada de estilosantes e mombaça obtido a menor taxa de recuperação, após 45 dias. Só foram recuperados os escleródios que apresentavam consistência rígida. Sutherst, Jones e Schnitzerling (1982) relataram que as plantas de estilosantes são recobertas por tricomas ou pelos que secretam um fluido viscoso que atua como repelente contra insetos que se alimentam de plantas. Tem também reputação reconhecida contra carrapatos, com redução da população onde essas plantas são encontradas (ZIMMERMAN; GARRIS; BEAVER, 1984). Assim, é provável que as plantas de estilosantes liberem substâncias capazes de prejudicar a integridade dos escleródios ou propiciar aumento na flora de organismos antagonistas.

Tabela 1 Taxa de recuperação dos escleródios após 40 dias de acondicionamento no solo em contato com os restos culturais das plantas de cobertura

Plantas de cobertura	Taxa de recuperação dos escleródios
	%
Estilosante	5,55a
Mombaça	16,65a
Milheto	19,44bc
Feijão-guandu-anão	19,44bc
Crotalária	30,55c
<i>Brachiaria ruziziensis</i>	94,45d
Testemunha	86,11d
CV	15,27

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, pelo teste de F.

Para os tratamentos que tinham as coberturas de milheto, crotalária e feijão-guandu-anão não houve diferença estatística. Esses tratamentos se comportaram de maneira intermediária em relação aos demais.

A maior taxa de recuperação foi obtida no tratamento que tinha as palhadas de *B. ruziziensis*, sendo estatisticamente iguais à testemunha. Segundo Görden et al. (2009), a palhada de *B. ruziziensis* contribui para o aumento do parasitismo de escleródios. Deve ser ressaltado que o estágio fenológico da cultura exerce significativa influência na quantidade de biomassa produzida, a qual refletirá no teor de matéria orgânica e, por consequência, na atividade biológica desse solo, estimulando, além de outros microrganismos, a flora antagonista ao escleródio. Acredita-se que a cobertura vegetal proporcionada pela planta tenha protegido as estruturas de resistência da ação de seres antagonistas.

As plantas de cobertura, depois de ceifadas e deixadas sobre o solo, são fontes nutricionais sem nenhuma proteção, visto que elas não são capazes de produzir de maneira eficiente mecanismos que as protegem da ação de organismos (Figura 1). Com base nisso, foi observado que essas plantas de cobertura permitiram níveis diferenciados de parasitismos aos escleródios, fato

não observado sobre aqueles alocados sobre a testemunha e o tratamento com *Brachiaria ruziziensis*. A taxa de recuperação dos escleródios foi afetada devido à ação de fungos e bactérias, e, ainda, à presença de um díptero da família Sciridae, conhecida como *Bradysia coprophila*, que se aproveitou do material orgânico disponível para a alimentação e a oviposição, respectivamente. Vários autores relatam o consumo dos escleródios pelas larvas *Bradysia coprophila* (ANAS; REELEDER, 1988; GRACIA-GARZA; REELEDER; PAULITZ, 1997).

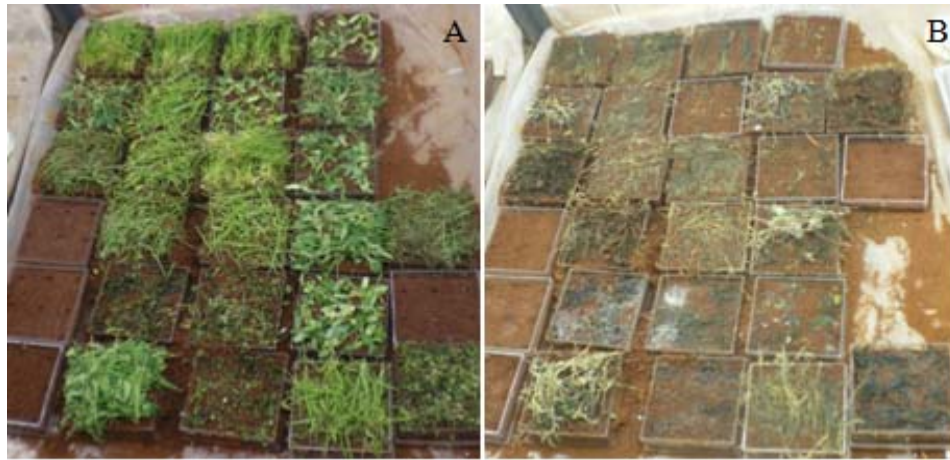


Figura 1 Plantas de cobertura, A) ceifadas e postas sob o solo após 30 dias de cultivo; B) em fase de decomposição, aos 62 dias

A colonização dos escleródios por esses microrganismos pode ser explicada pela baixa relação C/N das fitomassas, bem como o estágio fenológico em que foram ceifadas. Segundo Kappes et al. (2009), a decomposição da palhada é acelerada devido à baixa relação C/N, o que pode favorecer o maior crescimento de fungos e bactérias antagonistas que atuam indiretamente nas estruturas de resistência do fungo.

### 3.3 Índice da velocidade do crescimento micelial

Os resultados expostos na Tabela 2 demonstram que o índice da velocidade do crescimento micelial dos escleródios acondicionados no solo foi significativamente diferente entre os tratamentos.

Tabela 2 Índice da velocidade de crescimento micelial dos escleródios acondicionados por 40 dias no solo na presença de restos culturais de diferentes plantas de cobertura

Plantas de cobertura	Índice de velocidade de crescimento micelial
Estilosante	1,37a
Milheto	2,95b
<i>Brachiaria ruziziensis</i>	3,03b
Mombaça	3,13b
Crotalária	3,37b
Feijão-guandu-anão	3,19b
Testemunha solo	3,24b
Testemunha tubo	3,71c
CV	7,95

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, pelo teste de F.

Os escleródios alocados sobre a palha de estilosantes obteve o menor índice de crescimento, enquanto os escleródios armazenados em tubo tipo falcon obtiveram o maior. Isso pode ser explicado pela diferença existente na integridade dos escleródios nesses dois tratamentos.

Os escleródios armazenados no tubo, por estarem num ambiente que não permite o desenvolvimento dos organismos antagonistas, não sofreu dano na camada de melanina, tendo o procedimento padrão para a desinfestação sido suficiente para a erradicação de agentes antagonistas associados a estes de forma latente.

Já os escleródios provenientes do tratamento com estilosantes apresentavam-se sem a camada de melanização completa, o que permitiu uma rápida germinação micelial quando colocado em meio de cultura BDA. No entanto, após 12 horas, houve uma redução drástica na taxa de crescimento. Segundo Huang (1985), a germinação micelial de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* está associada ao grau de melanização da parede celular da casca dos escleródios. O autor relata, ainda, que uma melanização incompleta promove a imediata germinação micelial.

Foi observado que a camada de melanização é consumida pela ação de organismos antagonistas. Anas e Reeleder (1988) relatam que o dano aos escleródios por uma população antagonista foi maior quando o teor de matéria orgânica passou de 7% para 80%. Isso explica por que a ação de organismos (fungos, bactérias e inseto) incidiu nos tratamentos com cobertura vegetal. Constatou-se que, quando o escleródio não apresenta a camada de melanização, existe uma relação íntima entre este e os microrganismos antagonistas (Figura 2).

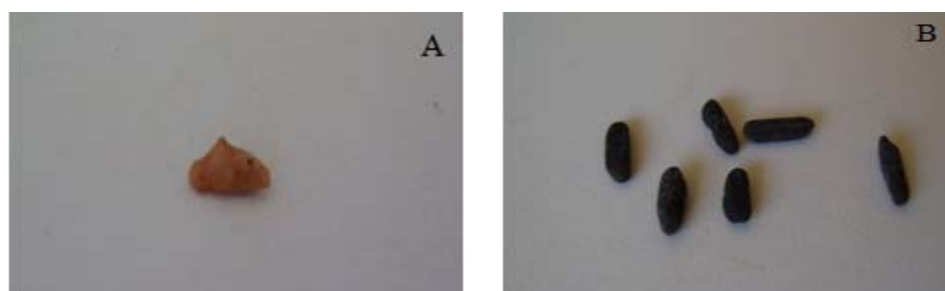


Figura 2 Escleródios recuperados do solo após 45 dias em contato com as plantas de cobertura, A) escleródios sem a camada de melanização; B) escleródios com a camada de melanização completa armazenados em tubo tipo falcon

Neste experimento, mesmo utilizando um procedimento de desinfestação considerado drástico (2 minutos de imersão dos escleródios no álcool a 70%, 5 minutos no hipoclorito de sódio a 2%, seguido de 3 lavagens



sucessivas em água destilada esterilizada), não foi possível a retirada de microrganismos associados às estruturas de resistência. A presença de organismos antagonista foi confirmada após esses escleródios terem sido colocados em placas de Petri contendo meio BDA.

Os demais tratamentos se comportaram de maneira intermediária. Foi observado que os escleródios alocados na testemunha-solo, tratamento sem as plantas de cobertura, sofreu redução na taxa de crescimento.

### 3.4 Germinação carpogênica em diferentes substratos

Os resultados da germinação carpogênica nos diferentes substratos apresentaram diferença estatística (Figura 1). No tratamento com areia obteve-se o menor valor, tanto para número de escleródios germinados como para o número de apotécios formados.

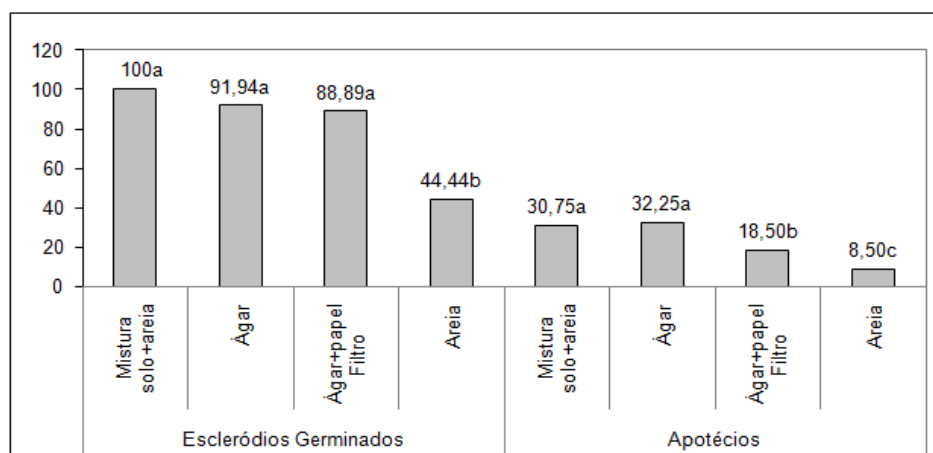


Gráfico 1 Porcentagem de escleródios germinados e número de apotécios germinados em diferentes substratos

Médias seguidas por letras iguais, nos escleródios e apotécios germinados, separadamente, não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de F

As observações realizadas permitem inferir que o principal fator que afeta a germinação, quando se utiliza esse tipo de substrato, é a dificuldade na manutenção da umidade, o que acarreta menor germinação. O comportamento intermediário do tratamento com ágar-água+papel filtro é explicado pela alta perda de água do papel, o que deixa o escleródio numa superfície seca.

O tratamento com mistura areia+solo e ágar-água apresentaram os maiores valores para as duas variáveis analisadas. O tratamento ágar-água é um substrato isento de nutrientes, por isso pode-se deduzir que, para a germinação carpogênica, não é vital a presença destes. Esses resultados discordam dos de Purdy e Grogan (1954), que relataram a dependência de macro e micronutrientes para indução da germinação carpogênica em meio líquido e cultura de ágar. Vega e Tourneau (1974) também relataram a dependência do elemento zinco nesse tipo de germinação (Figura 3).

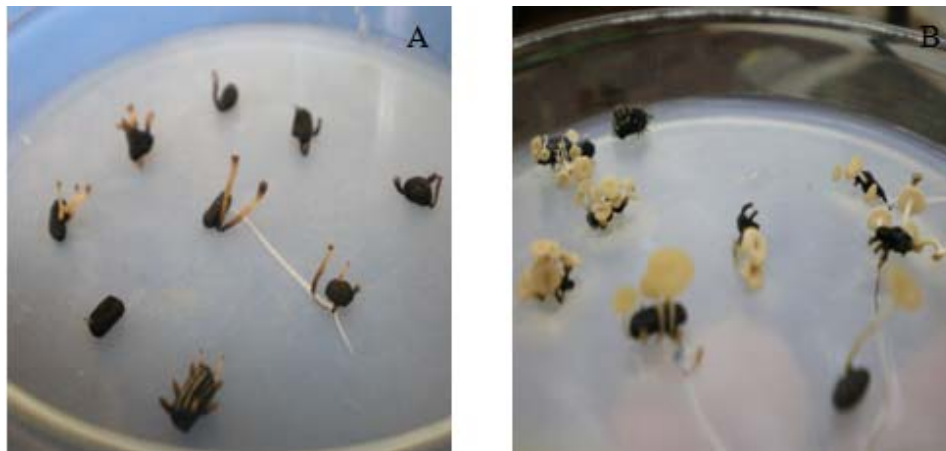


Figura 3 Germinação carpogênica em ágar-água, A) após 30 dias de incubação; B) após 42 dias de incubação à umidade e temperatura adequada

Outros autores relatam que o tipo de solo, o que representa um substrato, influencia a germinação carpogênica (COSTA; COSTA, 2006). Embora não contabilizadas, foram observadas diferenças quanto à germinação micelial. No

substrato com solo+areia foi possível perceber a produção de micélio pelos escleródios na primeira semana após a instalação do experimento, fato não observado para o substrato ágar+água, que só apresentou a formação de apotécios.

Com base na comparação entre o substrato areia+solo e ágar-água, é possível deduzir que a disponibilidade de nutrientes influencia a germinação micelial. Resultado similar foi encontrado por Gonçalves, Silva e Boff (2004), na ocorrência de *Peronospora destructor* em cebola.

Diante das observações realizadas durante a condução do experimento e com base nos substratos utilizados é possível inferir que os fatores essenciais para a formação do apotécio são a umidade e a temperatura adequada. Quando a germinação carpogênica é induzida em câmara de crescimento BOD, o fato de abrir a porta periodicamente pode influenciar o tempo de obtenção dos apotécios, devido às trocas de calor que ocorrem entre o meio interno e o meio externo. De acordo com diversos autores, temperatura de 20°C, umidade disponível na forma líquida, umidade relativa acima de 60 % e alta intensidade luminosa são condições favoráveis à produção de apotécio (HAO; SUBBARAO; DUNIWAY, 2003; SUN; YANG, 2000).

#### 4 CONCLUSÕES

A menor taxa de recuperação dos escleródios é observada sob as coberturas vegetais de estilosantes e capim-mombaça;

A testemunha e o tratamento com *Brachiaria ruziziensis* obtiveram as maiores taxas de recuperação;

Nos escleródios armazenados no tubo obtém-se o maior índice de velocidade de crescimento micelial. Os escleródios acondicionados sob as plantas de estilosantes obtiveram o menor valor;

As diferenças no índice de velocidade de crescimento micelial é devido a diferenças na integridade dessa estrutura de resistência, bem como pela influência de organismos antagonistas;

Maior germinação carpogênica de escleródios e formação de apotécios é observada nos substratos ágar-água e a mistura solo+areia.

## REFERÊNCIAS

- ANAS, O.; REELEDER, R. D. Consumption of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* by larvae of *Bradysia coprophila*: influence of soil factors and interaction between larvae and *Trichoderma viride*. **Soil Biology and Biochemistry**, San Diego, v. 20, n. 5, p. 619-624, Sept./Oct. 1988.
- CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, S. S. A rizosfera. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia dos solos**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 1992. p. 41-58.
- CHARCHAR, M. J. A.; ANJO, J. R. N.; OSSUPI, E. Algodão como hospedeira de *Sclerotinia sclerotiorum* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 256-258, ago. 1997. Suplemento.
- 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. 81-87, abr./jun. 2006.
- DEBIASI, H. et al. Produtividade de soja e milho após coberturas de inverno e descompactação mecânica do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 6, p. 603-612, jun. 2010.
- GONÇALVES, P. A. S.; SILVA, C. R. S.; BOFF, P. Incidência do míldio em cebola sob adubação mineral e orgânica. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 538-542, set. 2004.
- GÖRGEN, C. A. et al. Controle do mofo-branco com palhada e *Thichoderma harzianum* 1306 em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 12, p. 1583-1590, dez. 2009.
- GRACIA-GARZA, J. A.; REELEDER, R. D.; PAULITZ, T. C. Degradation of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* by fungus gnats (*Bradysia coprophila*) and the biocontrol fungi *Trichoderma* spp. **Soil Biology and Biochemistry**, Saint Paul, v. 29, n. 2, p. 123-129, Feb. 1997.
- HAO, J. J.; SUBBARAO, K. V.; DUNIWAY, J. M. Germination of *Sclerotinia minor* and *S. Sclerotiorum* sclerotia under various soil moisture and temperature combinations. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 4, p. 443-450, Apr. 2003.

HOFFMAN, D. D. et al. Yield and seed quality of soybean cultivars infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, n. 7, p. 826-829, July 1998.

HUANG, H. C. Factors affecting myceliogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, Palo Alto, v. 75, n. 4, p. 433-437, Apr. 1985.

KAPPES, C. et al. Influência do nitrogênio no desempenho produtivo do milho cultivado na segunda safra em sucessão à soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 39, n. 3, p. 251-259, jul./set. 2009.

KLUTHCOUSKI, J. et al. **Cultivo do feijoeiro em palhada de braquiária**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2003. 28 p. (Documentos, 157).

MACHADO, L. A. Z.; ASSIS, P. G. G. Produção de palha e forragem por espécies anuais e perenes em sucessão à soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 4, p. 415-422, abr. 2010.

MARSCHNER, P. et al. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Saint Paul, v. 33, n. 11, p. 1437-1446, Sept. 2001.

MENEZES, M.; SILVA-HANLIN, D. M. W. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. Recife: UFRPE, 1997. 106 p.

MORETINI, A.; MELO, I. S. Formulação do fungo *Coniothyrium minitans* para controle do mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 2, p. 155-161, fev. 2007.

NASSER, L. C. B. et al. **Método alternativo para o manejo do cancro-da-haste da soja (*Diaphorte phaseolorum f. sp. Meridionalis*) e mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em sistemas de produção de grãos do Cerrado**. Brasília: EMBRAPA, 1999. 4 p. (Comunicado Técnico, 11).

OLIVEIRA, S. H. F. Manejo do mofo branco. **DBO Agrotecnologia**, São Paulo, v. 2, n. 4, p. 1-4, maio/jul. 2005.

PEREIRA, J. C.; NEVES, M. C. P.; DROZDOWICZ, A. Dinâmica das populações bacterianas em solos de cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 5, p. 801-811, maio 1999.

- PURDY, L. H.; GROGAN, R. G. Physiological studies of *Sclerotinia sclerotiorum* in liquid and agar culture. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 44, n. 1, p. 36-38, Jan. 1954.
- ROCHA, F. S.; CAMPOS, V. P.; SOUZA, R. M. Efeito de exsudatos radiculares em endósporos de *Pausteria penetrans* e em juvenis do Segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, p. 644-650, dez. 2004.
- SALGADO, A. P. S. P. et al. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 249-254, mar./abr. 2003.
- SUN, P.; YANG, X. B. Light, temperature, and moisture effects on apothecium production of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 12, p. 1287-1293, Dec. 2000.
- SUTHERST, R. W.; JONES, R. J.; SCHNITZERLING, H. J. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. **Nature**, London, v. 295, n. 28, p. 320-321, Jan. 1982.
- TOLEDO-SOUZA, E. D. et al. Sistemas de cultivo, sucessões de culturas, densidade do solo e sobrevivência de patógenos de solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 8, p. 971-978, ago. 2008.
- VALARINI, P. J.; SPADOTTO, C. A. Identificação de nichos de sobrevivência de fitopatógenos em áreas irrigadas de Guaíra, SP. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 10, p. 1239-1243, out. 1995.
- VEGA, R. R.; TOURNEAU, L. D. The effect of zinc on growth and sclerotial formation in *Whetzelinia sclerotiorum*. **Mycologia**, New York, v. 66, n. 2, p. 256-264, Mar./Apr. 1974.
- ZIMMERMAN, R. H.; GARRIS, G. I.; BEAVER, J. S. Potential of *Stylosanthes* plants as a component in an integrated pest management approach to tick control. **Preventive Veterinary Medicine**, Fort Collins, v. 2, n. 1/4, p. 579-588, Mar. 1984.

### CAPÍTULO 3

#### **Extratos vegetais de plantas de cobertura no desenvolvimento de *Sclerotinia sclerotiorum***

#### **RESUMO**

Alguns extratos vegetais, devido às suas propriedades antagônicas, asseguram a sanidade das plantas ou partes destas, por evitarem a penetração ou impedir o desenvolvimento de patógenos. Outros extratos atuam de maneira diferente, promovendo o desenvolvimento de microrganismos. Com base nessas propriedades, este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar o efeito dos extratos aquosos das plantas de cobertura crotalária (*Crotalaria juncea* L.), braquiária (*Brachiaria ruziziensis*), capim-mombaça (*Panicum maximum* cv. mombaça), milheto (*Pennisetum glaucum*), feijão-guandu-anão (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) e estilosantes (*Stylosanthes capitata* x *Stylosanthes macrocephala*) sobre o crescimento micelial, germinação carpogênica e micelial dos escleródios e germinação dos ascósporos do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Todas as etapas do experimento foram desenvolvidas em casa de vegetação, câmaras de crescimento e laboratório. As concentrações dos extratos utilizadas foram de 1%, 5%, 10% e 25%. Para verificar a influência dos extratos sobre a germinação micelial e carpogênica dos escleródios, foi utilizada apenas a concentração de 25%. Os resultados sobre o crescimento micelial mostraram que o extrato da planta estilosantes teve efeito na inibição apenas na concentração de 25%; nas demais concentrações, este permaneceu igual à testemunha. A partir da concentração de 5%, os outros extratos promoveram o crescimento micelial. Para a germinação micelial dos escleródios, verificou-se que quase todos os extratos, exceção para estilosantes, induziram a germinação 12 horas após a instalação do experimento. Na formação de apotécio, os extratos se comportaram de maneira diferenciada aos 45 dias após a instalação do experimento. Para o número de escleródios germinados carpogenicamente, os extratos se comportaram de maneira diferente, aos 45 e aos 59 dias. Na germinação dos ascósporos, apenas o extrato de estilosantes obteve sucesso, pois impediu a germinação e, ainda assim, somente quando não foi utilizado antibiótico.

Palavras-chave: Plantas de cobertura. Manejo cultural. *Sclerotinia sclerotiorum*.



## ABSTRACT

Some plant extracts due to its antagonistic properties ensure the health of plants or parts thereof for preventing the penetration or prevent the development of pathogens. Other extracts act differently promoting the development of microorganisms. Based on these properties the objective was to study the effect of aqueous extracts of plant cover crotalaria (*Crotalaria juncea* L.), brachiaria (*Brachiaria ruziziensis*), panicum maximum grass (*Panicum maximum* cv. mombaça), millet (*Pennisetum glaucum*), pigeon pea dwarf bean (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) and stylosanthes (*Stylosanthes macrocephala* x *Stylosanthes capitata*) on mycelial growth, mycelial and carpogenic germination of sclerotia and ascospore germination of *Sclerotinia sclerotiorum*. All stages of the experiment were grown in a greenhouse, growth chambers and laboratory. The concentrations of the extracts used were 1, 5, 10 and 25%. To check the influence of extracts on mycelial and carpogenic germination of sclerotia was used only the concentration of 25%. The results on the mycelial growth showed that the plant extract of stylosanthes had effect on the inhibition only at concentration of 25% in other concentrations it remained the same witness. From the concentration of 5% the other extracts promoted mycelial growth. For mycelial germination of sclerotia was observed that almost all extracts, except for stylosanthes induced germination after 12 hours of the experiment instalation. In the formation of apothecium extracts behaved differently at 45 days. For the number of sclerotia germinated carpogenic extracts behaved differently at 45 and 59 days. On germination of ascospores only extract stylosanthes successfully preventing germination, and yet only when it was used antibiotics.

Keywords: Cover crops. Cultural management. *Sclerotinia sclerotiorum*.

## 1 INTRODUÇÃO

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* foi relatado, pela primeira vez, por Bary, em 1884. Possui esporo conhecido com ascósporo. Quando este germina, produz micélio. À medida que este micélio se compacta, dá origem a uma estrutura de resistência conhecida como escleródio, que produz corpos de frutificação chamados de apotécio. Dentro destes existem um número variável de ascos, estrutura em forma de saco, que libera oito ascósporos para o ambiente, recomeçando o ciclo (PURDY, 1979). É incluído no reino Fungi, filo Ascomycota, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae (AGRIOS, 2005), sendo patogênico a 48 famílias, 278 gêneros e 408 espécies de plantas (BOLAND; RALL, 1994). O amplo espectro de hospedeiros é um dos aspectos que dificultam o manejo do fungo.

O estudo de fatores relacionados com o solo, entre eles o efeito causado pela presença de plantas em áreas infestadas pelo fungo, são relevantes, uma vez que aproximadamente 90% do ciclo de vida ocorre no solo (ADAMS; AYERS, 1979; ASIRIFI; MORGAN; PARBERY, 1994). Essas plantas liberam, de maneira gradual, devido à ação da decomposição, compostos que influenciam o desenvolvimento do patógeno. Segundo Hao, Subbarao e Koike (2003), resíduos de brócolis reduzem a viabilidade dos escleródios de *Sclerotinia minor*, efeito atribuído a glucosinolatos. A fitomassa de *Chenopodium quinoa* pode reduzir a viabilidade de *S. sclerotium*, pois algumas cultivares apresentam saponinas, substâncias prejudiciais ao desenvolvimento do fungo (DUBEY et al., 1983). Desse modo, o estudo dos extratos de plantas pode ser uma maneira de conhecer o efeito desses compostos que seriam liberados no solo.

Nos últimos cinco anos, os produtores de soja, feijão, girassol e algodão de diversas regiões do cerrado, nos estados de Goiás, Minas Gerais e Bahia, estão convivendo com danos crescentes em suas lavouras, aumento nos custos

de produção e perdas econômicas superiores a 30%, em consequência da ocorrência do mofo-branco, doença causada pelo fungo (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2010). Para tentar controlar o fungo, várias táticas têm sido empregadas, entre elas a utilização de plantas de cobertura que liberam compostos no solo na tentativa de diminuir o potencial de inóculo (COSTA; RAVA, 2003; FERRAZ et al., 1999; GÖRGEN et al., 2009).

Segundo Sonaglio et al. (2003), extratos são todos os produtos obtidos a partir de matéria-prima vegetal. As substâncias podem ser extraídas por meio de diferentes metodologias preparadas em meio aquoso, etanoico, hidroetanoico ou oleoso, entre outros, com o objetivo de extrair da planta compostos específicos (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). A presença do extrato no substrato do microrganismo pode inibir seu crescimento pela presença de substâncias antagônicas. No emprego de plantas aromáticas, na tentativa de controlar o patógeno, vários extratos obtiveram resultado satisfatório (RODRIGUES et al., 2007; SOUZA; ARAÚJO; NASCIMENTO, 2007). Entretanto, ao empregar extratos de espécies hospedeiras, pode haver promoção no desenvolvimento, provavelmente devido à presença de substâncias atrativas (LEANDRO et al., 2003).

Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de conhecer a influência dos extratos vegetais de plantas de cobertura utilizadas na agricultura sobre o crescimento micelial, germinação micelial e carpogênica dos escleródios e germinação dos ascósporos do fungo de *Sclerotinia sclerotiorum*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi composto de sete tratamentos, em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, instalado em Lavras, MG, localizada à 21°14'43" latitude sul, 44° 59'59" longitude oeste e altitude de 919 m. O experimento foi conduzido de janeiro a julho de 2010. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e, quando significativo pelo teste F, as médias foram comparadas pelo teste estatístico, por meio da ferramenta Sisvar.

### 2.1 Obtenção dos extratos das plantas de cobertura

As plantas de crotalária (*Crotalaria juncea* L.), braquiária (*Brachiaria ruziziensis*), capim-mombaça (*Panicum maximum* cv. mombaça), milheto (*Pennisetum glaucum*), feijão-guandu-anão (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) e estilosantes (*Stylosanthes capitata* x *Stylosanthes macrocephala*) foram semeadas num Latossolo Vermelho-Escuro, em vasos com capacidade para 8 kg, cultivadas até os 45 dias após a emergência. Atingido esse período, a parte aérea das plantas foi ceifada e foi utilizada como matéria-prima para a obtenção dos extratos. Foram trituradas, num liquidificador, 100g de folhas, num volume de 200 ml de água.

A mistura obtida foi filtrada em peneira, sendo posteriormente submetida a um processo de esterilização com membranas antimicrobianas com porosidade de 0,22 µm. Obtidos os extratos, foram preparadas diferentes concentrações (1%, 5%, 10% e 25%), por meio de diluição em água destilada. Os extratos foram armazenados em frascos Erlenmeyer envoltos com papel alumínio para evitar a degradação pela luz de compostos presentes no extrato e

armazenados no freezer, a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para que suas propriedades fossem conservadas.

## **2.2 Extratos sobre o crescimento micelial**

Para avaliar o efeito dos extratos vegetais sobre o crescimento micelial do fungo, foram utilizadas placas de Petri estéreis com 9 mm de diâmetro. Os extratos obtidos foram adicionados ao meio de cultura BDA líquido (batata-ágar-dextrose) e as concentrações (1%, 5%, 10% e 25%) ajustadas em função da quantidade de meio adicionado na placa (20 ml). A testemunha continha apenas o meio BDA sem adição de extratos vegetais e, para compensar a quantidade de extrato inserida nos outros tratamentos foi adicionado água destilada esterilizada.

Para verificar o comportamento do fungo em função dos extratos, foi adicionado um disco de meio de cultura BDA contendo micélio de *Sclerotinia sclerotiorum*, previamente cultivado, disposto no centro da placa que continha os extratos diluídos. As placas foram vedadas com parafilme e acondicionadas em câmeras de crescimento BOD, à temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações do crescimento micelial foram feitas a cada 12 horas, até que este preenchesse toda a placa. De posse dos dados, o índice da velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi calculado pela fórmula adaptada por Salgado et al. (2003).

## **2.3 Extratos na germinação micelial e carpogênica dos escleródios**

Para a avaliação da germinação micelial e carpogênica dos escleródios, utilizaram-se caixas plásticas Gerbox, preenchidas até a metade pela mistura de solo e areia, na proporção de 1:1. A mistura utilizada foi previamente

esterilizada via autoclavagem, conforme metodologia específica desenvolvida por Menezes e Silva-Hanlin (1997). Foram adicionados 50 ml de cada extrato a 25% nessas caixas plásticas. Os extratos foram separados segundo as partes utilizadas para o preparo dos mesmos que, com exceção do estilosantes, foram separados em hastes e folhas. A umidade foi ajustada até a capacidade de campo pela adição de água destilada esterilizada.

Os escleródios, após desinfestados em solução de álcool a 70%, por 30 segundos e hipoclorito de sódio a 2%, por 2 minutos, seguindo-se três lavagens sucessivas em água destilada esterilizada, foram imersos nos extratos por 5 minutos, em função de cada tratamento. Após esse procedimento, foram dispostos 16 escleródios, de maneira equidistante, nas caixas plásticas preparadas. Em seguida, essas caixas foram fechadas com tampa apropriada e as laterais vedadas com parafilme. Após esse processo, foram acondicionadas em câmara de crescimento BOD, à temperatura de 20°C e fotoperíodo de 12 horas, por 45 dias, período suficiente para a produção de apotécio.

Avaliaram-se o tipo de germinação (micelial ou carpogênica), a porcentagem de escleródios germinados e o número de apotécios formados.

#### **2.4 Extratos vegetais na germinação dos ascósporos**

Para avaliar a influência dos extratos vegetais sobre os ascósporos de *Sclerotinia sclerotiorum*, os escleródios foram dispostos em caixas plásticas Gerbox, nas mesmas condições da testemunha do item 2.3. Após a germinação dos apotécios, cinco destas estruturas foram imersas em 10 ml de água destilada contida num cadinho e foram macerados com o pistilo por 3 minutos. Assim, foi obtida a suspensão de ascósporos.

Neste experimento, foi utilizada a placa destinada para o teste conhecido como ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), tendo cada orifício desta

placa recebido um tratamento. Foram transferidos para esses orifícios 100µl da suspensão de ascósporos, tendo cada concentração (1%, 5%, 10% e 25%) sido obtida por meio de diluição em água destilada esterilizada, bem como pela adição dos extratos. Essa placa foi mantida em câmara de crescimento BOD, à temperatura de 20°C e fotoperíodo de 12 horas.

O mesmo procedimento foi repetido duas vezes, com uma diferença. No primeiro não houve a adição de nenhum antibiótico; já no segundo, foram adicionados 10 g de sulfato de streptomicina.

Para verificar o efeito direto sobre a germinação dos ascósporos, foi utilizada a objetiva de 40 vezes de um microscópio óptico, em que os primeiros 100 ascósporos visualizados foram discriminados em: germinados, quando o crescimento micelial era duas vezes o diâmetro do ascósporo ou não germinados, depois de decorridas 24 e 48 horas da instalação do experimento. O resultado utilizado foi a média de 4 avaliações, realizadas para aferir a germinação do ascósporo.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Influência do extrato vegetal no crescimento micelial

Os resultados apresentados na Tabela 1 demonstram que as plantas de cobertura influenciaram o crescimento micelial a partir da concentração de 5%. Na concentração de 5%, os extratos das plantas milheto e mombaça foram os tratamentos que obtiveram os maiores índices de velocidade de crescimento, seguidos de *Brachiaria ruziziensis*, crotalária e feijão-guandu-anão. De acordo com o resultado, é possível deduzir que o aporte de substâncias ou nutrientes fornecidos por essas plantas tenha promovido o crescimento do fungo, visto que a testemunha obteve o menor valor de IVC, sendo estatisticamente igual ao estilosantes.

Tabela 1 Extratos das plantas de cobertura em diferentes concentrações sobre o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*

Extrato aquoso	Índice de velocidade de crescimento micelial			
	Concentração			
	1%	5%	10%	25%
Estilosante	4.7629a	5.7895a	5.0812a	0.1500a
Milheto	4.7672a	8.1020c	7.9479b	8.4125d
<i>Brachiaria ruziziensis</i>	4.7678a	7.4979b	7.8375b	6.5646c
Mombaça	4.7653a	8.8020c	7.2833b	7.4479d
Crotalária	4.9283a	7.1229b	7.0145b	8.0645d
Feijão-guandu-anão	4.7620a	7.1166b	6.3625b	6.6958c
Testemunha	4.7687a	4.7687a	4.7687a	4.7687b
CV				14,70

Médias seguidas com a mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

Na concentração de 10%, os extratos das plantas de cobertura se comportam de maneira semelhante à concentração anterior, tendo a testemunha e o tratamento com estilosantes diferido dos demais tratamentos.



Na concentração de 25%, os extratos das plantas milheto, mombaça e crotalária obtiveram as maiores taxas de crescimento micelial, seguidos de *Brachiaria ruziziensis* e feijão-guandu-anão.

Os resultados não concordam com os resultados obtidos por Pinto et al. (1998), que verificaram que o extrato aquoso de *Crotalaria paulina* inibiu o crescimento micelial de *Sclerotium cepivorum* em 67%, 53% e 27%, nas doses de 0,01%, 0,1% e 1%, respectivamente. Os autores observaram também que o extrato aquoso de *Brachiaria humidicola* reduziu o crescimento micelial em torno de 64% na dose de 1%. Esses autores atribuíram o efeito do sucesso devido à concentração de saponinas.

No presente trabalho, o único extrato que reduziu o crescimento micelial foi o extrato da planta de estilosantes, que pode conter compostos nocivos aos fungos, em altas concentrações. Segundo Sutherst, Jones e Schnitzerling (1982), as plantas de estilosantes são recobertas por tricomas que secretam um fluido viscoso, responsável pela defesa contra insetos que se alimentam de plantas. É possível afirmar que esse fluido pode apresentar também ação antifúngica. Zimmerman, Garris e Beaver (1984) ressaltam que essas plantas apresentam papel reconhecido contra carrapatos. Sendo assim, ao obter extratos aquosos destas plantas, substâncias antagônicas a alguns organismos, entre eles o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, podem ser extraídas.

### **3.2 Influência do extrato das plantas de cobertura na germinação micelial do escleródio**

A germinação micelial dos escleródios ocorreu 12 horas após a instalação do experimento, conforme dados da Tabela 2. Foi observado denso crescimento micelial para todos os tratamentos, com exceção do extrato de estilosantes e testemunha.

Tabela 2 Porcentagem de germinação micelial dos escleródios, em função dos extratos aquosos a 25%, 12 horas após a instalação do experimento

Extrato aquoso	Germinação micelial dos escleródios
	%
Estilosante	11,25a
Milheto folha	50,00b
Milheto haste	47,00b
<i>Brachiaria rhuzizienzis</i> folha	48,50b
<i>Brachiaria rhuzizienzis</i> haste	47,00b
Mombaça folha	47,00b
Mombaça haste	47,00b
Crotalária folha	47,00b
Crotalária haste	47,00b
Feijão-guandu-anão folha	47,00b
Feijão-guandu-anão haste	47,00b
Testemunha	9,50a
CV	8,08

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Na avaliação dos 14 dias, foi verificado que não houve germinação de outros escleródios e os valores se mantiveram iguais aos da primeira avaliação. Os resultados mostram que os extratos das plantas estudadas interagem com o fungo, promovendo um denso crescimento micelial. Segundo Huang (1985), a completa formação da cada de melanização impede a imediata germinação de escleródios na falta de nutrientes fornecidos exogenamente, o que promove dormência. Então, pode-se inferir que os extratos das plantas de cobertura, com exceção do extrato de estilosantes, fornecem quantidade adicional de nutrientes, o que permite a germinação em poucas horas. A ocorrência da germinação na testemunha e no tratamento com estilosantes pode ser explicada pela existência de nutrientes presentes na mistura solo+areia suficientes para incitar germinação. Lopes et al. (2008) admitem a possibilidade da relação entre fertilidade do solo e incidência de *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense*.

### 3.3 Influência do extrato vegetal sobre a germinação de apotécios

Os resultados mostraram que o número de apotécios germinados não diferiu estatisticamente para os tratamentos aos 30 e 37 dias após a instalação do experimento (Tabela 3).

Tabela 3 Extratos das plantas de cobertura sobre a germinação de apotécios dos escleródios, em função dos dias após a instalação do experimento

Extrato aquoso	Número de apotécios germinados			
	Dias após a instalação			
	30	37	45	59
Estilosante	0,75a	9,75a	16,00ab	6,75a
Milheto folha	1,50a	9,75a	17,50ab	6,50a
Milheto haste	2,00a	10,75a	18,75ab	7,75a
<i>Brachiaria ruziziensis</i> folha	3,25a	11,50a	17,25ab	5,25a
<i>Brachiaria ruziziensis</i> haste	0,25a	3,00a	10,25ab	6,25a
Mombaça folha	1,50a	9,75a	19,75ab	12,00a
Mombaça haste	1,00a	12,50a	15,00ab	5,75a
Crotalária folha	1,00a	7,50a	13,75ab	12,00a
Crotalária haste	1,25a	7,00a	15,75ab	12,25a
Feijão-guandu-anão folha	1,50a	4,25a	6,75a	3,00a
Feijão-guandu-anão haste	0,75a	7,50a	16,25ab	7,75a
Testemunha	2,25a	11,50a	24,00b	13,50a
CV				38,37

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Aos 45 dias, o tratamento feijão-guandu-anão-folha diferiu da testemunha, porém, foi igual aos demais tratamentos. Aos 59 dias, não houve diferença significativa entre o número de apotécios formados, mas foi observada significativa redução de apotécio, devido à morte dos que germinaram primeiro.

Com base nos resultados, a germinação de apotécios não se apresentou influenciada pela presença dos extratos. É importante ressaltar que não existe um número determinado de apotécios que um escleródio pode produzir.

### 3.4 Influência do extrato vegetal sobre o número de escleródios germinados carpogênicamente

Os resultados expressos na Tabela 4 seguiram a tendência em relação ao número de apotécios germinados, não tendo o número de escleródios germinados carpogênicamente diferido entre os tratamentos na primeira e na segunda avaliação, ocorrida aos 30 e aos 37 dias após a instalação do experimento.

Tabela 4 Porcentagem de escleródios germinados carpogênicamente, em função dos extratos vegetais

Extratos aquosos	Porcentagem de escleródios germinados			
	Dias após a instalação			
	30	37	45	59
Estilosante	3,12a	32,81a	54,69ab	18,75ab
Milheto folha	9,37a	39,05a	56,25ab	28,12ab
Milheto haste	9,38a	42,19a	64,06ab	23,48ab
<i>Brachiaria ruziziensis</i> folha	6,25a	42,19a	57,81ab	29,69ab
<i>Brachiaria ruziziensis</i> haste	1,56a	17,19a	40,62ab	26,56ab
Mombaça folha	7,81a	31,25a	57,81ab	50,00ab
Mombaça haste	4,69a	48,44a	60,94ab	26,56ab
Crotalária folha	6,25a	26,56a	53,12ab	50,00ab
Crotalária haste	4,69a	32,81a	51,56ab	68,63b
Feijão-guandu-anão folha	6,25a	17,19a	28,10a	12,50a
Feijão-guandu-anão haste	1,56a	28,13a	59,37ab	26,56ab
Testemunha	7,81a	37,50a	81,25b	59,38ab
CV				30,94

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Na avaliação de 45 dias, o tratamento feijão-guandu-anão-folha diferiu da testemunha, porém, foi igual aos demais tratamentos. A testemunha também foi estatisticamente igual aos demais tratamentos. Aos 59 dias, o tratamento com

feijão-guandu-anão folha diferiu dos valores obtidos para o tratamento crotalária haste. No entanto, não houve diferença entre os demais tratamentos.

Com base nos resultados, é possível deduzir que a presença de extratos vegetais não afeta o número de escleródios germinados carpogenicamente.

### **3.5 Porcentagem de germinação dos ascósporos, em função dos extratos das plantas de cobertura com e sem a adição de sulfato de streptomicina**

O início da germinação ocorreu duas horas e trinta minutos após a instalação do experimento (Figura 2). Assim, pode-se deduzir que a germinação dos ascósporos no campo inicia-se pouco tempo depois da liberação destes pelo apotécio.



Figura 2 Ascósporos de *Sclerotinia sclerotiorum* germinado e não germinado

Na avaliação para discriminar quantos ascósporos estavam germinados, foi observada a presença de uma população microbiana composta principalmente de bactérias, quando não foi adicionado antibiótico. Essa

população se encontrava associada aos apotécios utilizados para a obtenção da suspensão de ascósporos e, em função desta população influenciada pelos extratos das plantas de cobertura, obtiveram-se comportamentos diferenciados para a germinação dos esporos do fungo (Tabela 5).

Tabela 5 Porcentagem de germinação dos ascósporos, em função dos extratos das plantas de cobertura com e sem adição de sulfato de streptomina

Extratos aquosos	Com adição de antibiótico			
	24 horas			
	1%	5%	10%	25%
Estilosante	95a	96a	97a	97a
Milheto	95a	96a	97a	97a
<i>Brachiaria ruziziensis</i>	98a	97a	98a	98a
Mombaça	97a	96a	96a	98a
Crotalária	100a	100a	96a	99a
Feijão-guandu-anão	95a	96a	96a	97a
Testemunha	98a	97a	96a	95a
CV				1,12
	24 horas			
	Sem adição de antibiótico			
Estilosante	43a	36a	29a	23a
Milheto	99,25b	100b	100b	100b
<i>Brachiaria ruziziensis</i>	100b	100b	100b	100b
Mombaça	100b	100b	100b	100b
Crotalária	100b	100b	100b	100b
Feijão-guandu-anão	100b	100b	100b	100b
Testemunha	77,25c	78,00c	77,35c	79c
	48 horas			
	Sem adição de antibiótico			
Estilosante	26,98a	27,05a	27a	27,25a
Milheto	99,25b	100b	100b	100b
<i>Brachiaria ruziziensis</i>	100b	100b	100b	100b
Mombaça	100b	100b	100b	100b
Crotalária	100b	100b	100b	100b
Feijão-guandu-anão	100b	100b	100b	100b
Testemunha	89,25c	89,35c	87,93c	88,76c
CV				1,19

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

Os resultados expressos na Tabela 5 demonstram que os extratos das plantas de cobertura, em todas as concentrações, não diferiram, após 24 horas da instalação do experimento, em relação à testemunha, quando adicionado sulfato de streptomicina, tendo os resultados sido semelhantes após 48 horas. Embora não tenha havido diferença quanto à germinação, foi possível observar maior desenvolvimento micelial às 48 horas nos tratamentos com extratos de milho, *Brachiaria ruziziensis* e feijão-guandu-anão, em relação à testemunha. Neste caso, é provável que esses extratos sirvam como substrato ao desenvolvimento do fungo.

Quando não adicionado o sulfato de streptomicina, a população microbiana se comportou de maneira diferenciada entre os tratamentos. Em todas as concentrações testadas o extrato de estilosantes inibiu a germinação dos ascósporos por permitir o aumento da população de microrganismos. Sugere-se que, neste extrato, existam compostos atrativos ao seu desenvolvimento. Como consequência do aumento desta população, maior quantidade de substâncias nocivas ao fungo pode ser produzida. Segundo Kennedy (1999), as bactérias produzem metabólitos capazes de inibir o crescimento de outros microrganismos.

Nos demais tratamentos, os extratos foram eficientes na indução da germinação, mesmo quando presente uma população microbiana. O aporte de nutrientes fornecidos por esses extratos pode ter permitido a plena germinação dos ascósporos, anulando os efeitos da população microbiana. Os resultados da testemunha, ausência de extrato, suportam a ideia do aporte de nutrientes, já que neste tratamento obteve-se menor número de ascósporos germinados e foi observado menor crescimento micelial às 48 horas da instalação do experimento.

#### 4 CONCLUSÕES

A 25%, o extrato de estilosantes controla o desenvolvimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio BDA. Os demais extratos servem de substrato ao desenvolvimento do fungo;

Os extratos das plantas de cobertura, com exceção do estilosantes, também induzem o crescimento micelial dos escleródios, porém, não influenciam a germinação carpogênica e o número de apotécios formados;

O extrato da planta de estilosantes age indiretamente, impedindo a germinação dos ascósporos por induzir o aumento da flora microbiana associada ao apotécio. Os demais extratos induzem o crescimento micelial dos ascósporos.



## REFERÊNCIAS

- ADAMS, P. B.; AYERS, W. A. Ecology of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 896-899, Aug. 1979.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. New York: Academic, 2005. 922 p.
- ASIRIFI, K. N.; MORGAN, W. C.; PARBERY, D. G. Supression of Sclerotinia soft rot of lettuce with organic soil amendmets. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Gatton, v. 34, n. 1, p. 131-136, Dec. 1994.
- BOLAND, G. J.; RALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 16, n. 2, p. 93-108, June 1994.
- COSTA, J. G. C.; RAVA, C. A. Influência da braquiária no manejo de doenças do feijoeiro com origem no solo. In: KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F.; AIDAR, H. **Integração lavoura-pecuária**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2003. p. 523-533.
- DUBEY, N. K. et al. Fungitoxicity of some higher plants against *Rhizoctonia solani*. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 72, n. 1, p. 91-94, Jan./May 1983.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Pesquisa estuda manejo para controle do mofo branco**. Brasília, 2010. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2010/janeiro/2a-semana/embrapa-estuda-manejo-para-controle-do-mofo-branco>>. Acesso em: 20 jun. 2010.
- FERRAZ, L. C. L. et al. Effects of soil moisture, organic matter and Grass mulching on the carpogenic germination of sclerotia and infection of bean by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 48, n. 1, p. 77-82, Feb. 1999.
- GÖRGEN, C. A. et al. Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 12, p. 1583-1590, dez. 2009.
- HAO, J.; SUBBARAO, K. V.; KOIKE, T. Effects of broccoli rotation on *Lettuce* drop caused by *sclerotinia minor* and on the population density of sclerotia in soil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, n. 2, p. 159-166, Feb. 2003.

- HUANG, H. C. Factors affecting myceliogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 75, n. 4, p. 433-437, Apr. 1985.
- KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Zürich, v. 74, n. 1/3, p. 65-76, June 1999.
- LEANDRO, L. F. S. et al. Strawberry plant extracts stimulate secondary conidiation by *Colletotrichum acutatum* on symptomless leaves. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 10, p. 1285-1291, Oct. 2003.
- LOPES, E. B. et al. Influência de fatores químicos do solo sobre a incidência do mal-do-Panamá na bananeira cv. Pacovan na Paraíba. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 8, n. 1, p. 100-109, jan./jun. 2008.
- MENEZES, M.; SILVA-HANLIN, D. M. W. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. Recife: UFRPE, 1997. 106 p.
- PINTO, C. M. F. et al. *In vitro* effect of plant leaf extracts on mycelial growth and sclerotial germination of *Sclerotium cepivorum*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 146, n. 8/9, p. 421-425, Sept. 1998.
- PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 875-880, Aug. 1979.
- QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 68-76, jan./fev. 2001.
- RODRIGUES, E. et al. Fungitoxicidade atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 2, p. 124-128, jun. 2007.
- SALGADO, A. P. S. P. et al. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 249-254, mar./abr. 2003.

SONAGLIO, D. et al. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2003. p. 289-326.

SOUZA, A. E. F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L. C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 465-471, dez. 2007.

SUTHERST, R. W.; JONES, R. J.; SCHNITZERLING, H. J. Tropical legumes of the genus stylosanthes immobilize and kill cattle ticks. **Nature**, London, v. 295, n. 28, p. 320-321, Jan. 1982.

ZIMMERMAN, R. H.; GARRIS, G. I.; BEAVER, J. S. Potential of stylosanthes plants as a component in a integrated pest management approach to tick control. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 2, n. 1, p. 579-588, Mar. 1984.

## CAPÍTULO 4

### **Exsudatos radiculares de plantas de cobertura no desenvolvimento de *Sclerotinia sclerotiorum***

#### **RESUMO**

O sistema radicular das plantas, além da função de sustentação e absorção de água e nutrientes, exerce grande influência sobre a população de microrganismos presentes no solo. Devido às substâncias que exsudam, as raízes determinam o quimiotactismo, positivo ou negativo, de acordo com compostos atrativos ou repelentes, respectivamente. Assim, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de conhecer a influência de alguns exsudatos radiculares das plantas de cobertura conhecidas como crotalária, capim-braquiária, capim-mombaça, milheto, feijão-guandu-anão e estilosantes. Para a liberação dos exsudatos, as raízes de plantas cultivadas durante 24 dias foram submetidas à centrifugação, a 1.890 rotações por minuto, durante 10 minutos. Obtido os exsudatos, estes foram esterilizados por processos de filtração, com a utilização de membrana com poro de 0,22µm. Os filtrados foram armazenados em tubos e acondicionados a -20°C, para posterior utilização. O efeito dos exsudatos foi estudado em relação a crescimento micelial, germinação micelial e carpogênica do escleródio e germinação dos ascósporos de *Sclerotinia sclerotiorum*. As concentrações utilizadas foram 1%, 10% e 25%, obtidas por meio da diluição em água destilada esterilizada. Os resultados mostraram que no crescimento micelial houve diferença em função do exsudato nas concentrações de 1% e 10%. Os exsudatos não influenciaram a germinação micelial dos escleródios. Para a germinação carpogênica, houve diferença quanto ao número de apotécios germinados aos 52 e 60 dias após a instalação do experimento. Quanto aos ascósporos, os exsudatos radiculares de feijão-guandu-anão e estilosantes inibiram a germinação quando não foi adicionado sulfato de streptomina.

Palavras-chave: Manejo cultural. Exsudato radicular. *Sclerotinia sclerotiorum*.

## ABSTRACT

The root system of plants beyond the supporting function and absorption of nutrients and water exerts great influence on the population of microorganisms in the soil. Due to these substances by the roots exsuded determine the chemotactic, positive or negative, according to attractive or repellent compounds, respectively. So the objective was to explore the influence of root exudates of some cover plants known as *Crotalaria juncea*, *Brachiaria rhuiziensis*, *Panicum maximum* cv. mombaça, *Pennisetum glaucum*, *Cajanus cajan* and stylosanthes. For the release of exudates roots of plants grown for 24 days, were subjected to centrifugation at 1890 rpm for 10 minutes. Retrieved these exudates were sterilized by filtering processes using a membrane with pore size of 0.22 micrometers. The filtrates were stored in tubes and stored at -20 ° C for later use. The effect of the exudates were studied in relation to mycelial growth, mycelial and carpogenic germination of sclerotia and germination of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. The concentrations used were 1, 10 and 25% obtained by dilution in sterile water. The results showed significant difference in mycelial growth as a function of the exudates at concentrations of 1 and 10%. The exudates did not affect mycelial germination of sclerotia. For carpogenic germination the only difference was in the number of apothecia germinated at 52 and 60 days after the experiment. Concerning the ascospores of *Cajanus cajan* and Stylosanthes root exudates inhibited germination when it was added streptomycin sulfate.

Keywords: Management culture. Root exudate. *Sclerotinia sclerotiorum*.

## 1 INTRODUÇÃO

As raízes das plantas, além da função de sustentação, absorção de água e nutrientes, produzem também compostos conhecidos como exsudatos radiculares. Esses compostos são substâncias produzidas pelas plantas e liberadas no ambiente, neste caso na rizosfera. Segundo Jones e Darrah (1993), os principais componentes desses exsudatos são glucídeos, ácidos orgânicos, aminoácidos e compostos fenólicos.

Siqueira, Safir e Nair (1991) relataram que os isoflavonoides formononetina e biocanina, exsudatos por raízes de trevo, estimulam o crescimento micelial e a colonização das raízes por fungos micorrízicos-arbusculares. Segundo Smith e Gianinazzi-Pearson (1989), alguns sinais das plantas, oriundos de exsudatos, podem ser necessários para o crescimento micelial de fungos, mesmo que não ocorra contato físico.

A proporção e a composição desses compostos variam em função da espécie da planta, das condições fisiológicas, da idade da planta, de impedimentos mecânicos ao crescimento da raiz, da condição nutricional e de fatores ambientais (BAREA et al., 2005; LIU et al., 2004; RICHARDSON et al., 2009). Segundo Liebersback, Steingrodt e Claassen (2004), sob certas condições de estresse hídrico e nutricional há um incremento na liberação de exsudatos radiculares. Em vários estudos tem sido demonstrado que pode haver diferenças quanto à liberação de exsudatos dentro da mesma espécie. Alguns autores relatam que vários genótipos influenciam a comunidade microbiana presente nas raízes, em razão da diferença na sinalização eliciada, principalmente se está em situação de estresse (BAREA et al., 2005; HINSINGER, 2001; MARSCHNER et al., 2001).

Esses exsudatos radiculares podem exercer quimiotactismo na interação com microrganismos do solo, sendo positivo quando essas substâncias são

atrativas e negativo quando estas são repelentes. Hawes e Brigham (1992) apresentaram possíveis mecanismos para melhor compreender a interação entre os exsudatos e os microrganismos. De acordo com esses autores, o efeito pode ser direto, com a atração para rizosfera e provimento de nutrientes para o crescimento de microrganismos e indiretos, com o estímulo do crescimento de microrganismos antagonistas e mudanças no ambiente químico. Hungria et al. (1997) relatam que exsudatos oriundos de feijão e milho incrementam a taxa de crescimento de *Rhizobium* sp. e *Azospirillum lipoferum*, respectivamente, responsáveis pela fixação biológica nessas plantas.

Segundo Nelson (1990), muitos fungos fitopatogênicos sobrevivem no solo em estado quiescente. Para sair deste estado, há a necessidade do contato entre moléculas presentes em exsudatos de sementes e raízes e o propágulo dormente para que as interações patógeno-raiz se iniciem. Propágulos de quase todos os gêneros de fitopatógenos habitantes do solo respondem aos exsudatos das sementes e raízes (BOWEN; ROVIRA, 1991). Segundo Becard e Piche (1989), os exsudatos atuam como indutores da formação do apressório, promovendo o contato entre a hifa fúngica e a célula vegetal, e assim atua também no processo pré-infectivo do fungo. Coelho et al. (2007) admitem que é possível que as raízes da alface produza exsudato que estimula o crescimento bacteriano.

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* está incluído no reino Fungi, filo Ascomycota, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae (AGRIOS, 2005). O amplo espectro de hospedeiros é um dos aspectos que dificultam o seu manejo. Segundo Boland e Rall (1994), é patogênico a 48 famílias, 278 gêneros e 408 espécies de plantas. A capacidade infectiva dos propágulos deste fungo é adquirida somente após a absorção de determinadas substâncias químicas, como açúcares e aminoácidos (REDINGTON; PETERSON, 1971; SCHROTH;

SNYDER, 1960). Em outros fungos, o exsudato produzido pelo vegetal pode exercer ação inibitória ou deletéria (DHINGRA; SINCLAIR, 1985).

Neste contexto, este trabalho foi realizado com o objetivo de conhecer a influência dos exsudatos radiculares das plantas de cobertura sobre crescimento micelial, germinação micelial e carpogênica dos escleródios e germinação dos ascósporos do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi composto de sete tratamentos, em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, instalado em Lavras, MG, localizada a 21°14'43" latitude sul, 44° 59'59" longitude oeste e altitude de 919 m. O experimento foi conduzido de janeiro a julho de 2010. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e, quando significativo pelo teste F, as médias foram comparadas pelo teste estatístico, por meio da ferramenta Sisvar.

### 2.1 Obtenção dos exsudatos radiculares das plantas de cobertura

Foram utilizadas as plantas de cobertura crotalária (*Crotalaria juncea* L.), braquiária (*Brachiaria ruziziensis*), capim-mombaça (*Panicum maximum* cv. Mombaça), milheto (*Pennisetum glaucum*), feijão-guandu-anão (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) e estilosantes (*Stylosanthes capitata* x *Stylosanthes macrocephala*).

Os exsudatos radiculares foram obtidos de acordo com a metodologia desenvolvida por Campos, Campos e Coimbra (2006). Para a produção de raízes, as plantas de cobertura foram semeadas em bandejas contendo areia esterilizada com a utilização de autoclave, segundo metodologia desenvolvida por Menezes e Silva-Hanlin (1997). Após o plantio, elas foram mantidas em casa de vegetação por um período de 24 dias, após o que as plantas foram levadas ao laboratório.

Na câmara de fluxo laminar, os sistemas radiculares foram separados da parte aérea pelo corte na região do colo e transferidos para placas de Petri com papel filtro estéril, umedecido com água destilada esterilizada. Após essa operação, as raízes foram colocadas em tubo plástico cônico de 45 mm de altura

com 10 mm de diâmetro superior e 4 mm de diâmetro inferior (adaptação feita com ponteira de 1 ml e tubos Ependorf de 1,5µl). Esse diâmetro inferior foi seccionado e recoberto com uma membrana de 0,22 µ, sobreposta por uma tela de 0,025 mm para evitar o rompimento da membrana.

Na parte superior do tubo, foram colocadas as raízes, sendo vedado na extremidade com parafilme. Após esse procedimento, todo o conjunto foi centrifugado, a 1.890 rpm, por 10 minutos. Na centrifugação, o exsudato radicular da superfície das raízes passou pela membrana, sendo depositado no tubo inferior. Em seguida, o tubo com o exsudato foi devidamente vedado e armazenado sob ausência de luz, a -20°C, para posterior utilização.

## **2.2 Influência dos exsudatos radiculares sobre o crescimento micelial**

Para avaliar o efeito dos exsudatos radiculares sobre o crescimento micelial do fungo, foram utilizadas placas de Petri estéreis com 9 mm de diâmetro, que foram preenchidas com 20 ml do meio BDA (batata-ágar-dextrose). Antes da solidificação do meio, foram adicionados os exsudatos das plantas de cobertura. As concentrações utilizadas foram de 1%, 10% e 25%. Cada placa recebeu apenas um exsudato com seu respectivo tratamento numa determinada concentração. A testemunha continha somente o meio BDA sem adição dos exsudatos radiculares. Após esse processo, um disco de BDA contendo micélio foi disposto no centro da placa.

As placas foram vedadas com parafilme e acondicionadas em câmara de crescimento BOD, à temperatura de 20°C e fotoperíodo de 12 horas. As avaliações do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* foi feita a cada 12 horas, até que este preenchesse toda a placa. O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi calculado pela fórmula adaptada por Salgado et al. (2003).

### **2.3 Influência dos exsudatos radiculares na germinação micelial e carpogênica dos escleródios**

Para avaliar o efeito dos exsudatos radiculares das plantas de cobertura foram utilizadas caixas plásticas Gerbox preenchidas até a metade pela mistura de solo e areia, previamente esterilizada com a utilização de autoclave, na proporção de 1:1. Foram adicionados 50 ml de água destilada para garantir um ambiente adequado para a germinação dos escleródios.

Os escleródios ficaram imersos por 5 minutos em cada exsudato respectivo ao tratamento. Após esse procedimento, foram dispostos 16 escleródios em cada caixa plástica, de maneira equidistante. A caixa foi fechada com tampa e as laterais vedadas com parafilme.

As caixas foram mantidas em câmara de crescimento BOD, à temperatura de 20°C e fotoperíodo de 12 horas, por um período de 45 dias, o suficiente para a formação de apotécio. Com a formação dos primeiros apotécios, 100 µl de cada exsudato radicular foi adicionado em cima de cada escleródio com seu respectivo tratamento. Foram avaliados o número de escleródios germinados, o tipo de germinação e o número total de apotécios formados.

### **2.4 Influência dos exsudatos radiculares sobre a germinação dos ascósporos**

Para avaliar a influência dos exsudatos radiculares sobre os ascósporos de *Sclerotinia sclerotiorum*, os escleródios foram dispostos em caixas plásticas Gerbox, nas mesmas condições da testemunha do item 2.3. Após a germinação dos apotécios, cinco dessas estruturas foram imersas em 10 ml de água destilada contida num cadinho e foram macerados com o pistilo por 3 minutos. Assim, foi obtida a suspensão de ascósporos.

Neste experimento, foi utilizada a placa destinada para o teste conhecido como ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), tendo cada orifício desta placa recebido um tratamento. Foram transferidos para esses orifícios 100 µl da suspensão de ascósporos, tendo cada concentração (1%, 5%, 10% e 25%) sido obtida por meio de diluição em água destilada esterilizada, bem como pela adição dos exsudatos radiculares. Essa placa foi mantida em câmara de crescimento BOD, à temperatura de 20°C e fotoperíodo de 12 horas.

O mesmo procedimento foi repetido duas vezes, com uma diferença: no primeiro não houve a adição de nenhum antibiótico, enquanto no segundo foram adicionados 10 g de sulfato de streptomicina.

Para verificar o efeito direto sobre a germinação dos ascósporos foi utilizada a objetiva de 40 vezes de um microscópio óptico, em que os primeiros 100 ascósporos visualizados foram discriminados em germinados, quando o crescimento micelial era duas vezes o diâmetro do ascósporo ou não germinados, depois de decorridas 24 e 48 horas da instalação do experimento. O resultado utilizado foi a média de 4 avaliações realizadas para aferir a germinação do ascósporo.

### 3 RESULTADO E DISCUSSÃO

#### 3.1 Influência dos exsudatos radiculares no crescimento micelial

Os resultados da Tabela 1 demonstram que, na concentração de 1%, os exsudatos radiculares das plantas *Brachiaria ruziziensis*, crotalaria e feijão-guandu-anão obtiveram o menor índice de velocidade de crescimento micelial. Na concentração de 10%, apenas os exsudatos das plantas de *Brachiaria ruziziensis* obtiveram redução no índice de velocidade do crescimento micelial. Para a concentração de 25% não houve diferença entre os tratamentos.

Tabela 1 Exsudatos radiculares das plantas de cobertura em diferentes concentrações sobre o índice de velocidade de crescimento micelial

Exsudato radicular	Concentrações		
	IVCM		
	1%	10%	25%
Estilosante	14,60b	13,29b	14,13a
Milheto	13,64b	13,30b	13,03a
<i>Brachiaria ruziziensis</i>	12,01a	11,14a	13,01a
Mombaça	13,77b	14,72b	14,31a
Crotalaria	11,92a	13,09b	12,86a
Feijão-guandu-anão	12,01a	14,11b	14,16a
Testemunha	14,39b	14,39b	14,39a
CV			8,63

Médias seguidas com a mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

Os resultados permitem deduzir que as plantas de cobertura que obtiveram o menor índice de velocidade de crescimento micelial têm algumas substâncias que agem como inibidoras do crescimento micelial quando em baixas concentrações. Diz, Carvalho e Gomes (2003) relataram que as plantas exsudam substâncias através da superfície de raízes e alguns desses compostos possuem a função de proteção das plantas contra infecções bacterianas.

### 3.2 Influência dos exsudatos radiculares das plantas de cobertura na germinação micelial dos escleródios

Os exsudatos radiculares não influenciaram a germinação micelial dos escleródios (Tabela 2). A camada de melanização existente nos escleródios pode ter impedido o contato direto do exsudato radicular.

Tabela 2 Germinação micelial dos escleródios, decorridos 14 dias sobre a influência dos exsudatos radiculares de diferentes plantas de cobertura

Exsudato radicular	Crescimento micelial dos escleródios
	14 dias
Estilosante	1,10a
Milheto	1,21a
<i>Brachiaria ruziziensis</i>	1,10a
Mombaça	1,21a
Crotalária	1,31a
Feijão-guandu-anão	1,21a
Testemunha	1,21a
CV	18,95

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

Dados transformados  $(x+1)^{0,5}$ .

Embora o teor de nutrientes desses exsudatos não tenha sido determinado, pode ser que a quantidade destes nos exsudatos seja baixa, não tendo a quantidade empregada neste experimento sido suficiente para a promoção da germinação. Segundo Chitarra et al. (2002), o crescimento de *Colletotrichum gossypii* foi acentuado em substratos contendo exsudatos de sementes deslindadas de algodão.

### 3.3 Influência dos exsudatos radiculares das plantas de cobertura no número de apotécios germinados

Os resultados mostram que houve diferença entre os tratamentos apenas aos 52 e 60 após a instalação do experimento. Nessas avaliações, os exsudatos das plantas de estilosantes, *Brachiaria ruziziensis* e feijão-guandu-anão induziram maior formação de apotécios em relação aos demais tratamentos.

Tabela 3 Número de apotécios germinados sob a influência dos exsudatos radiculares das plantas de cobertura

Exsudato radicular	Número de apotécios germinados			
	Dias após a instalação			
	30	42	52	60
Estilosante	3,00a	19,75a	20,75b	23,25b
Milheto	1,50a	13,75a	18,33a	18,00a
<i>Brachiaria ruziziensis</i>	2,75a	15,75a	20,33b	22,25b
Mombaça	1,25a	12,25a	16,33a	17,50 a
Crotalária	3,75a	13,25a	15,00a	16,50a
Feijão-guandu-anão	2,25a	16,50a	22,67b	21,5b
Testemunha	4,00a	12,50a	16,33a	18,75a
CV	25,32			

Médias seguidas da mesma letra e na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

Pode-se admitir que os exsudatos liberados pelas plantas de cobertura estilosantes, *Brachiaria ruziziensis* e feijão-guandu-anão têm substâncias indutoras ou sinalizadoras para a germinação carpopogônica num maior espaço de tempo. Vale ressaltar que a quantidade de apotécios produzidos por um escleródio é variável, não existindo, ainda, explicação de forma clara sobre como esse evento ocorre.

### 3.4 Influência dos exsudatos radiculares das plantas de cobertura no número de escleródios germinados carpogenicamente

Os resultados da Tabela 4 demonstram que não houve diferença significativa em relação ao número de escleródios germinados. Assim, todos os exsudatos radiculares empregados não inibiram e nem promoveram a germinação carpogênica dos escleródios.

Tabela 4 Influência dos exsudatos das plantas de cobertura no número de escleródios germinados carpogenicamente

Exsudato radicular	N° de escleródios germinados carpogenicamente			
	30	42	52	60
Estilosante	16,67a	94,44a	94,45a	97,23a
Milheto	16,67a	86,11a	96,30a	94,45a
<i>Brachiaria ruziziensis</i>	19,44a	94,44a	100a	97,23a
Mombaça	8,33a	77,78a	92,45a	94,45a
Crotalária	22,22a	86,11a	88,89a	88,89a
Feijão-guandu-anão	19,44a	91,68a	92,60a	91,67a
Testemunha	24,99a	94,44a	96,30a	100a
CV				14,00

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

### 3.5 Influência dos exsudatos radiculares das plantas de cobertura no número de ascósporos germinados

Os resultados da Tabela 5 demonstram que, quando foi adicionado sulfato de streptomina, todos os exsudatos radiculares permitiram a germinação dos ascósporos, não tendo sido observadas diferenças quanto ao crescimento micelial dos ascósporos. Os resultados nas concentrações utilizadas não têm efeito sobre a germinação dos ascósporos.



Quando não foi adicionado sulfato de streptomicina, os exsudatos radiculares das plantas de estilosantes e feijão-guandu-anão obtiveram os menores valores, inibindo a germinação dos ascósporos. O resultado é explicado pelo expressivo aumento na população bacteriana promovida por esses exsudatos radiculares.

Tabela 5 Porcentagem de germinação dos ascósporos em função dos exsudatos radiculares das plantas de cobertura com e sem adição de sulfato de streptomicina

Extratos aquosos	Com adição de antibiótico			
	24 horas			
	1%	5%	10%	25%
Estilosante	95a	96a	97a	97a
Milheto	95a	96a	97a	97a
<i>Brachiaria ruziziensis</i>	98a	97a	98a	98a
Mombaça	97a	96a	96a	98a
Crotalária	100a	100a	96a	99a
Feijão-guandu-anão	95a	96a	96a	97a
Testemunha	98a	95a	93a	91a
CV				3,14
	24 horas			
	Sem adição de antibiótico			
	5a	4a	4a	3a
Estilosante	5a	4a	4a	3a
Milheto	98c	99c	97c	98c
<i>Brachiaria ruziziensis</i>	98c	99c	98c	100c
Mombaça	100c	97c	98c	95c
Crotalária	95c	98c	96c	100c
Feijão-guandu-anão	9a	8a	5a	7a
Testemunha	85b	86b	84b	79b
CV				3,59

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Segundo Balota et al. (1995), os exsudatos radiculares estimulam o crescimento na população de bactérias diazotróficas, *in vitro*, a partir das primeiras 24 horas. Paula e Siqueira (1990) relataram que os compostos exsudatos pela planta podem atuar como sinais moleculares, o que ativa o

crescimento micelial dos fungos, assim como o de bactérias. Com o aumento da população há o incremento na produção de metabólitos que podem possuir efeito fungistático ao fungo. De acordo com Kennedy (1999), as bactérias produzem metabólitos capazes de inibir o crescimento de outros microrganismos.

Vários autores relataram que a quantidade e a qualidade dos exsudatos liberados pela raiz alteram a composição química do solo e influenciam a comunidade bacteriana, colonizam a rizosfera e utilizam esses exsudatos como fonte de carbono (BAUDOIN; BENIZRI; GUCKERT, 2001; GRAYSTON et al., 1998; RICHARDSON et al., 2009).

A testemunha se comportou de maneira intermediária. Os exsudatos de milho, *Brachiaria ruziziensis*, mombaça e crotalária promoveram a germinação bem como um expressivo crescimento micelial dos ascósporos. Estes exsudatos podem conter compostos que estimulem o crescimento micelial. Resultados semelhantes foram encontrados por Balota et al. (1995), ao trabalharem com fungo micorrízico-arbuscular *Gigaspora gigantea*.

#### 4 CONCLUSÕES

Os exsudatos radiculares das plantas de cobertura *Brachiaria rhuziizensis*, crotalária e feijão-guandu-anão, na concentração de 1%, inibem o crescimento micelial. Os exsudatos radiculares de *Brachiaria rhuziizensis* na concentração de 10% inibem o crescimento micelial;

Os exsudatos radiculares não influenciam a germinação micelial e a germinação carpogênica dos escleródios;

Os exsudatos radiculares de estilosantes, *Brachiaria rhuziizensis* e feijão-guandu-anão promovem a germinação carpogênica aos 52 e aos 60 dias;

A germinação dos ascósporos é inibida pelos exsudatos das plantas estilosantes e feijão-guandu-anão, quando não é adicionado sulfato de streptomicina.

## REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. New York: Academic, 2005. 922 p.
- BALOTA, E. L. et al. Interações e efeitos fisiológicos de bactéria diazotróficas e fungos micorrízicos-arbusculares na mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 11, p. 1335-1345, nov. 1995.
- BAREA, J. M. et al. Microbial cooperation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 56, n. 417, p. 1761-1778, July 2005.
- BAUDOIN, E.; BENIZRI, E.; GUCKERT, A. Metabolic fingerprint of microbial communities from distinct maize rhizosphere compartments. **European Journal of Soil Biology**, Braunschweig, v. 37, n. 2, p. 85-93, Apr./June 2001.
- BECARD, G.; PICHE, Y. Fungal growth stimulation by CO<sub>2</sub> and root exsudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 9, p. 2320-2325, Sept. 1989.
- BOLAND, G. J.; RALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 16, n. 2, p. 93-108, June 1994.
- BOWEN, G. D.; ROVIRA, A. D. The rhizosphere: the rhizosphere, the hidden half of the hidden half. In: WAISEL, Y.; ESHAL, A.; KAFKAT, U. **Plant roots: the hidden half**. New York: M. Dekker, 1991. p. 641-669.
- CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P.; COIMBRA, J. L. Efeito de exsudatos radicular de *Brachiaria decubens* e do sorgoleone de *Sorghum bicolor* no desenvolvimento de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 59-65, abr. 2006.
- CHITARRA, L. G. et al. Efeito do deslincamento químico sobre a ocorrência e desenvolvimento de *Colletotrichum gossypii* associado às sementes de algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 128-133, abr. 2002.
- COELHO, L. F. et al. Interação de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* e de *Bacillus* spp. com a rizosfera de diferentes plantas. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, MG, v. 31, n. 6, p. 1413-1420, nov./dez. 2007.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. Boca Raton: CRC, 1985. 355 p.

DIZ, M. S. S.; CARVALHO, A. O.; GOMES, V. M. Purification and molecular mass determination of a lipid transfer protein exuded from *Vigna unguiculata* seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes, v. 15, n. 3, p. 171-175, Dec. 2003.

GRAYSTON, S. J. et al. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, San Diego, v. 30, n. 3, p. 369-378, Mar. 1998.

HAWES, M. C.; BRIGHAM, L. A. Impact of root border cells on microbial populations in the rhizosphere. **Advances in Plant Pathology**, London, v. 8, n. 6, p. 119-148, Dec. 1992.

HINSINGER, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 237, n. 2, p. 173-195, Dec. 2001.

HUNGRIA, M. et al. Interação entre microrganismos do solo, feijoeiro e milho em monocultura ou consórcio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 8, p. 807-818, ago. 1997.

JONES, D. L.; DARRAH, P. R. Re-absorption of organic compounds by roots of *Zea mays* L. and its consequences in the rhizosphere: II., experimental and model evidence for simultaneous exudation and re-absorption of soluble C compounds. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 153, n. 1, p. 47-59, June 1993.

KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Zürich, v. 74, n. 1/3, p. 65-76, June 1999.

LIEBERSBACH, H.; STEINGROBE, B.; CLAASSEN, N. Roots regulate ion transport in the rhizosphere to counteract reduced mobility in dry soil. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 10, n. 1/2, p. 79-88, Mar. 2004.

LIU, Y. et al. Rhizosphere effect and root growth of two maize (*Zea mays* L.) genotypes with contrasting P efficiency at low P availability. **Plant Science**, Shannon, v. 167, n. 2, p. 217-223, Aug. 2004.

MARSCHNER, P. et al. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, San Diego, v. 33, n. 11, p. 1437-1445, Sept. 2001.

MENEZES, M.; SILVA-HANLIN, D. M. W. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. Recife: UFRPE, 1997. 106 p.

NELSON, E. B. Exudate molecules initiating fungal responses to seeds and roots. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 129, n. 1, p. 61-73, Dec. 1990.

PAULA, M. A.; SIQUEIRA, S. D. Stimulation of hyphal growth of the va mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* by suspension-cultured *Pueraria phaseoleoides* cells and cell products. **New Phytologist**, Cambridge, v. 115, n. 1, p. 69-75, May 1990.

REDINGTON, C. B.; PETERSON, J. L. Influence of environment on *Albizzia julibrissin* root exudation and exudate effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *perniciosum* in soil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, n. 7, p. 812-815, July 1971.

RICHARDSON, A. E. et al. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 321, n. 1/2, p. 305-339, Aug. 2009.

SALGADO, A. P. S. P. et al. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 249-254, mar./abr. 2003.

SCHROTH, M. N.; SNYDER, W. C. Effect of host exudates on chlamydospore germination of the bean root rot fungus, *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 51, p. 389-393, Apr. 1960.

SIQUEIRA, J. O.; SAFIR, G. R.; NAIR, M. G. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of White clover by flavonoid compounds. **New Phytologist**, Cambridge, v. 118, n. 1, p. 87-93, May 1991.

SMITH, S. E.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 39, p. 221-244, June 1988.