

## USO DE INDUTORES ABIÓTICOS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL E FORMAÇÃO DE ESCLERÓDIOS DE *Sclerotinia sclerotiorum* E NO ACÚMULO DE GLICEOLINA EM SOJA

Francine S. Stefanski<sup>1\*</sup>, Brenda Tortelli<sup>1</sup>, Michele Fochesatto<sup>1</sup>, Alessandra Gallina<sup>1</sup>, Márcio P. Mezomo<sup>1</sup>, Lucas A. Favaretto<sup>1</sup>, Paola M. Milanese<sup>2</sup>

1. Estudantes de Agronomia, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS-Erechim)
2. Eng. Agrônoma, Professora Adjunta da UFFS-Erechim. Orientadora.

### Resumo

Com o objetivo de avaliar o efeito de indutores abióticos no controle *in vitro* do mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) e na indução de fitoalexinas em cotilédones de soja, foram realizados bioensaios. Os tratamentos avaliados foram os produtos Certeza<sup>®</sup>, Enerplant<sup>®</sup> e Vivamax<sup>®</sup> nas doses recomendadas pelos fabricantes e 50% para mais ou para menos, ácido salicílico (1, 2 e 4 mM) e testemunha. Determinou-se a inibição, o índice de velocidade de crescimento micelial, o número e o peso de escleródios. Os tratamentos foram incorporados ao meio BDA e mantidos em incubadora (25°C). Para fitoalexinas, sementes de soja foram cultivadas em areia estéril e após dez dias os cotilédones foram cortados, submetidos aos tratamentos e a gliceolina formada foi extraída e determinada em espectrofotômetro. O produto comercial Certeza<sup>®</sup> é eficiente contra *S. sclerotiorum* enquanto que o Vivamax<sup>®</sup> na dose recomendada apresenta potencial tanto sobre o patógeno quanto para a elicitação de compostos de defesa.

**Palavras-chave:** Mofo-branco; *Glycine max*; mecanismos de defesa.

### Introdução

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é o agente causal do mofo branco e está disseminado por todo país ocasionando significativos prejuízos aos produtores brasileiros. Sua disseminação ocorre através de sementes contaminadas, de escleródios que podem vir junto às sementes, ascósporos transportados pelo vento, dentre outros meios que podem atingir plantas suscetíveis e desencadear o desenvolvimento da doença. Uma vez introduzido na lavoura, o controle deste fitopatógeno torna-se difícil especialmente pela sua capacidade de causar doença em diversos gêneros de plantas e pela alta multiplicação e longa viabilidade de suas estruturas de resistência (ITO; PARISI, 2010).

Embora contribuam para o aumento da produtividade, o extensivo uso de agroquímicos tem ocasionado efeitos adversos ao meio ambiente e à saúde humana, o que tem despertado o interesse por métodos de controle mais sustentáveis, como o controle de doenças por indução de resistência através da ativação de mecanismos de defesa vegetal, os quais envolvem desde o reconhecimento da molécula eliciadora até a ativação e síntese de compostos pós-formados, como compostos fenólicos, fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (STANGARLIN et al., 2011). Esta ativação é uma resposta a um tratamento prévio que pode ser feito com indutores abióticos que podem desencadear o acúmulo de compostos tóxicos aos fungos e bactérias, como é o caso das fitoalexinas (CARVALHO, 2012).

Neste contexto, a utilização de moléculas e princípios ativos que induzam resistência em plantas e atuem no manejo de doenças vêm sendo realizadas, como é o caso do uso de fosfitos (CAMOCHENA, 2015), silício e acibenzolar-S-metil (CRUZ et al., 2013). No entanto, estudos envolvendo indutores abióticos, como os bioestimulantes, são incipientes para a ativação de mecanismos de defesa vegetal e o seu potencial sobre as plantas e seus patógenos ainda são pouco elucidadas. Desta forma, objetivou-se por meio deste trabalho avaliar os efeitos dos produtos Certeza<sup>®</sup>, Enerplant<sup>®</sup> e Vivamax<sup>®</sup> sobre a inibição, velocidade de crescimento micelial e produção de escleródios de *S. sclerotiorum*, assim como o potencial dos tratamentos frente ao acúmulo da fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja.

### Metodologia

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Erechim/RS. Para o desenvolvimento do trabalho e constituição dos tratamentos foram utilizados produtos comerciais na dosagem recomendada pelo fabricante, sendo: Enerplant<sup>®</sup> (carbono orgânico + molibdênio) (0,5 g/kg semente), Vivamax<sup>®</sup> (cera de *Euforbia cerifera* + cera de *Copernicia cerifera*) (20 g/20 L) e para avaliação do crescimento micelial foi utilizado o fungicida comercial Certeza<sup>®</sup> (tiofanato metílico + fluazinam) (180 mL/100 kg de sementes) como controle positivo. Também foi avaliada a metade da dose recomendada (REC), para mais (+50%) ou para menos (-50%) para os produtos, além de ácido salicílico (1, 2 e 4 mM) como indutor de referência e, além disso, uma testemunha.

**Crescimento micelial:** Os escleródios foram retirados de plantas com mofo-branco coletadas na cidade de Charrua/RS, desinfestados e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Os tratamentos foram incorporados ao meio BDA fundente (40 – 45 °C) e vertidos em placas de Petri. Após, discos de 5 mm de diâmetro contendo micélio de *S. sclerotiorum* foram adicionados ao centro de cada placa e mantidas em câmara incubadora a 25 °C e fotoperíodo de 12 h. Foram realizadas medições diárias do diâmetro das colônias com o auxílio de uma régua graduada em milímetros (mm), sendo que estas cessaram às 72 horas, quando a testemunha atingiu a borda da placa. Para cada tratamento foram feitas cinco repetições. Os dados obtidos foram utilizados nos cálculos de inibição do crescimento micelial (ICM, %) (HILLEN et al., 2012) e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM, mm/dia) (OLIVEIRA, 1991). Após 10 dias foram contabilizados o número de escleródios produzidos por placa (NE) e verificou-se o peso das estruturas (PE).

**Indução de fitoalexinas:** Sementes de soja da cultivar BRS 284 foram desinfestadas em hipoclorito de sódio 1%, lavadas em água destilada, semeadas em areia esterilizada e mantidas em condições ambientais durante 10 dias. Após esse período, os cotilédones foram destacados das plântulas, lavados em água destilada esterilizada (ADA) e cortados superficialmente na parte abaxial. Placas de Petri forradas com papel *germitest* umedecido com ADA receberam cinco cotilédones cada, sobre os quais foi depositada uma alíquota de 60 µL de cada tratamento, composto por três repetições cada. As placas foram tampadas e mantidas no escuro a 25 °C. Após 20 horas, os cotilédones foram transferidos para erlenmeyers de 125 mL contendo 10 mL de ADA, que foram agitados durante uma hora para extração da gliceolina. Em seguida, os cotilédones foram pesados, e a absorvância determinada a 285 nm, conforme Labanca (2002).

O delineamento utilizado para ambos os testes, foi o inteiramente casualizado e os resultados foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de significância com auxílio do *software* estatístico SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

## Resultados e Discussão

Para os testes de crescimento micelial, o fungicida comercial Certeza® inibiu em 100% a formação de micélio e conseqüentemente das estruturas de resistência de *S. sclerotiorum*, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos pelo teste de Tukey. Resultado semelhante foi observado por Figueiredo et al. (2010) no controle *in vitro* de *S. Sclerotiorum*, em que o tiofanato metílico afetou consideravelmente o crescimento do patógeno, mesmo nas concentrações mais baixas.

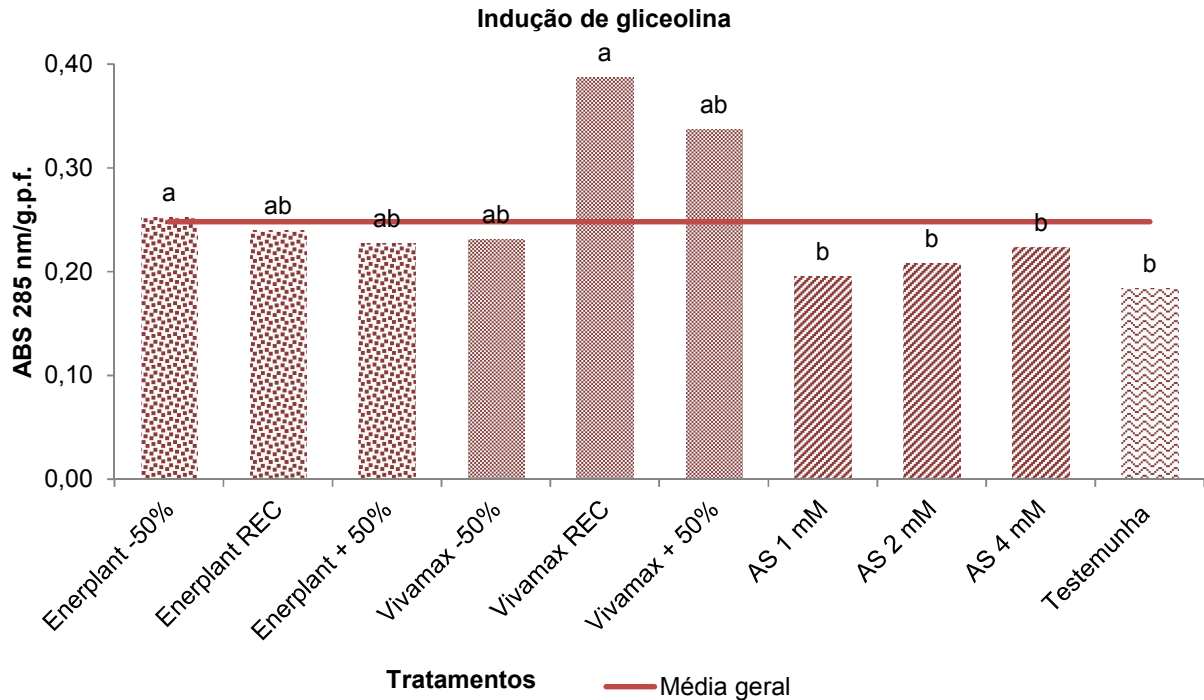
Para a variável ICM, o produto Vivamax® na dose recomendada pelo fabricante, inibiu de forma significativa o desenvolvimento do fungo até às 48 h, quando o mesmo diminuiu a velocidade do crescimento do patógeno, conforme a Tabela 1. Carminate et al. (2017), também verificaram o efeito inibidor de um fertilizante com ação bioestimulante sobre o crescimento de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* Alb. Além disso, o Vivamax®, na dose recomendada, proporcionou o maior acúmulo de gliceolina em cotilédones de soja (Gráfico 1), superando o tratamento controle em 161%, evidenciando seu poder fungistático sobre o mofo-branco e a sua capacidade de ativar mecanismos de defesa em soja.

Tratamentos	ICM (%)			IVCM (mm/dia)			NE	PE (g)
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h		
Certeza -50%	100,0 a	100,0 a	100,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,00 a
Certeza REC	100,0 a	100,0 a	100,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,00 a
Certeza +50%	100,0 a	100,0 a	100,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,00 a
Enerplant -50%	18,8 bc	12,1 bc	3,8 b	2,9 a	14,3 bc	43,2 b	20,0 ab	0,24 ab
Enerplant REC	18,9 bc	4,7 bc	0,0 b	2,9 a	15,8 c	45,0 b	29,6 b	0,38 b
Enerplant +50%	6,8 c	-8,9 c	0,0 b	3,7 a	18,4 c	45,0 b	38,8 b	0,33 b
Vivamax -50%	16,5 bc	1,0 bc	3,3 b	3,0 a	16,5 c	43,4 b	29,8 b	0,27 b
Vivamax REC	47,9 b	35,0 b	7,6 b	0,9 a	10,0 b	41,4 b	28,0 b	0,22 ab
Vivamax +50%	3,0 c	2,1 bc	2,1 b	3,9 a	16,3 c	44,0 b	31,0 b	0,37 b
AS 1 mM	-3,8 c	-8,9 c	0,0 b	4,4 a	18,4 c	45,0 b	27,2 b	0,33 b
AS 2 mM	9,7 c	-5,0 c	3,4 b	3,5 a	17,6 c	43,4 b	31,4 b	0,24 ab
AS 4 mM	0,8 c	-10,2 c	5,7 b	4,1 a	18,6 c	42,3 b	23,2 ab	0,28 b
Testemunha	0,0 c	0,0 c	0,0 b	4,1 a	16,7 c	45,0 b	22,4 ab	0,29 b

**Tabela 1.** Efeito dos tratamentos Certeza®, Enerplant®, Vivamax®, ácido salicílico (AS) e testemunha sobre a inibição do crescimento micelial (ICM, %), índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM, mm/dia), número de escleródios produzidos por placa (NE) e peso dos escleródios (PE). Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Na avaliação da quantidade de escleródios por placa, dois tratamentos de Enerplant® (REC e +50%), além de todos do produto Vivamax® bem como as concentrações mais baixas de ácido salicílico proporcionaram um incremento na formação destas estruturas de resistência. Isto pode estar relacionado ao

aporte de nutrientes oriundos dos tratamentos, pois para que estas estruturas se desenvolvam, é importante que os meios de cultura disponibilizem nutrientes que favoreçam o seu desenvolvimento (GARCIA, JULIATTI e CASSEMIRO, 2012). Corroborando aos dados desta pesquisa, Camochena (2015) observou que nenhum dos fosfitos testados em seu experimento apresentou ação antifúngica a *S. Sclerotiorum*, além de não interferirem na germinação dos escleródios.



**Gráfico 1.** Indução da fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja por Enerplant®, Vivamax®, ácido salicílico (AS) e testemunha (água destilada). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

O ácido salicílico, indutor de referência, não possui característica fungistática sobre *S. sclerotiorum* e nem eliciadora de compostos de defesa em cotilédones de soja. Durante as análises, foi observado que o crescimento das colônias do fungo expostas a este tratamento fora superior quando comparadas a testemunha, o que justifica a inibição negativa do crescimento micelial. Bertonceli et al. (2015), também não constataram efeito direto da aplicação de diferentes concentrações do indutor AS sobre o crescimento micelial de *Phyitium* sp. Da mesma forma que Blume et al. (2011), obtiveram resultados nos quais houve maior acúmulo da fitoalexina faseolina em hipocótilos de feijão tratados com extrato de guaco (*Mikania glomerata* Spreng.) do que com a testemunha positiva acibenzolar-S-metil.

### Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo comprovam que o fungicida Certeza® têm ação direta sobre o desenvolvimento de *S. sclerotiorum*, enquanto que o bioestimulante de plantas Vivamax® inibe o seu crescimento apenas nas primeiras horas de contato.

O bioestimulante Vivamax® na dose recomendada pelo fabricante, possibilita um maior acúmulo da fitoalexina gliceolina.

No entanto, maiores estudos necessitam ser realizados com bioestimulantes na promoção de respostas de defesa vegetal bem como no efeito fungistático destes sobre fungos fitopatogênicos.

### Referências bibliográficas

BERTONCELLI, D. J. et al. Ácido salicílico na indução de resistência a doenças em pepino e controle de *Pythium* sp. in vitro. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 14, n. 2, p. 124-131, 2015.

BLUME, E. et al. 12494-Indução de faseolina em *Phaseolus vulgaris* L. por diferentes concentrações de extrato de guaco (*Mikania glomerata* S.). **Cadernos de Agroecologia**, [S.l.] v. 6, n. 2, 2011.

- CAMOCHENA, R. C. **Desempenho de fosfitos de potássio no manejo de mofo branco em soja**. 2015. 79 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2015.
- CARMINATE, B. et al. Efeito “*in vitro*” de produtos comerciais sobre o crescimento de *Fusarium solani* F. sp. *piperis*. **Revista Univap**, v. 22, n. 40, p. 487, 2017.
- CARVALHO, N. L. Resistência genética induzida em plantas cultivadas. **Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology (REGET)**, v. 7, n. 7, p. 1379-1390, 2012.
- CRUZ, M. F. A. et al. Inducers of resistance and silicon on the activity of defense enzymes in the soybean-*Phakopsora pachyrhizi* interaction. **Bragantia**, v. 72, n. 2, p. 162-172, 2013.
- FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FIGUEIREDO, G. S. et al. Biological and chemical control of *Sclerotinia sclerotiorum* using *Trichoderma* spp. and *Ulocladium atrum* and pathogenicity to bean plants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 1, p. 1-9, Feb. 2010.
- GARCIA, R.Á.; JULIATTI, F.C.; CASSEMIRO, T.A. Produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em meio de cultura. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 1-7, 2012.
- HILLEN, T. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos *in vitro* e no tratamento de sementes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 3, p. 439-445, 2012.
- ITO, M. F.; PARISI, J. J. D. **Mofo branco: Doença que exige muita atenção principalmente no período outono inverno**. *Trichoderma* spp, em áreas cultivadas do cerrado. *JV Biotecnologia*. 2010. 9p. Disponível em: < <http://www.agronomianet.com.br/Trichoderma.pdf>> Acesso em: 23 mar. 2019.
- LABANCA, E.R.G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*)**. Piracicaba, 2002. 107p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura. “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- OLIVEIRA, J.A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. 1991. 111p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.
- STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18, 2011.