



Métodos de inoculação de *Rhizoctonia bataticola* (taub.) (*Macrophomina phaseolina* (tassi) goid) em sementes de feijão

Rhizoctonia inoculation methods bataticola (taub.) (*Phaseolina Macrophomina* (tassi) goid) in bean seeds

Raimunda Nonata Oliveira da Silva¹, Patricia Migliorini², Emanuele Junges³, Anita de Farias Nunes⁴, Lilian Vanussa Madruga de Tunes⁵

Resumo: A utilização de métodos de inoculação constitui uma ferramenta essencial no manejo de doenças, estudo de resistência, seleção e aplicação de produtos. O estudo teve como objetivo avaliar a eficiência de diferentes métodos de inoculação de *Rhizoctonia bataticola* em sementes de feijão. Os tratamentos constituíram de diferentes métodos de inoculação: suspensão de hifas, contato com restrição hídrica, inoculação do substrato com discos de BDA contendo micélio do fungo e um tratamento controle. Após a inoculação das sementes, foram feitas avaliações de emergência, comprimento de parte aérea, massa seca de parte aérea e incidência de doença na folha e no caule. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com oito repetições, sendo os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste a Tukey 5% de probabilidade. O método de inoculação por suspensão de hifas é o mais adequado para inoculação de *Rhizoctonia bataticola* em sementes de feijão, visto que proporcionou uma maior incidência de plântulas infectadas sem afetar a emergência.

Palavras chave: *Phaseolus vulgaris* L., inoculação de sementes, podridão radicular.

Abstract: The use of inoculation methods is an essential tool in the management of diseases, study of resistance, selection and application products. The study aimed to evaluate the efficiency of different *Rhizoctonia* inoculation methods *bataticola* in bean seeds. The treatments consisted of different methods of inoculation: hyphae suspension, contact with water restriction, inoculation of the substrate with BDA discs containing fungal mycelium and a control treatment. After inoculation of the seeds were made emergency assessments, shoot length, dry weight of shoot and incidence of disease in the leaf and stem. The experimental design was completely randomized with eight repetitions, the data and were subjected to analysis of variance and the averages were compared by Tukey test at 5% probability. The hyphal suspension for inoculation method is best suited for inoculation of *Rhizoctonia bataticola* bean seeds, as they provided a higher incidence of infected seedlings without affecting the emergency.

Key words: *Phaseolus vulgaris* L., seed inoculation, root rot.

*Autor para correspondência

Recebido para publicação em 11/05/2016; aprovado em 02/10/2016

¹Mestranda do PPG Ciência e Tecnologia de Sementes, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, Fone (53) 91633243, E-mail: nonas_agro@hotmail.com

²Doutoranda do PPG Ciência e Tecnologia de Sementes, Universidade Federal de Pelotas, E-mail: pati.migliorini@gmail.com

³Professora do Instituto Federal de Farroupilha, E-mail:junges.emanuele@gmail.com

⁴Acadêmica de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Email: anita.nunes.ortiz@hotmail.com

⁵Professora do PPG Ciência e Tecnologia de Sementes, Universidade Federal de Pelotas, E-mail: lilianmtunes@yahoo.com.br



INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) possui notória importância socioeconômica, seus grãos servem como fonte de proteínas, minerais e calorias na alimentação humana, além do grande destaque no cenário nacional (CARVALHO et al., 2014). Atualmente, o Brasil é maior produtor mundial de feijão, com produção estimada em torno de 3,301 milhões de toneladas e produtividade 1096 kg/ha (CONAB, 2016). Esta produtividade é considerada baixa, pois agricultores que usam altas tecnologias de produção podem ultrapassar os 3.000kg/ha (PEREIRA et al., 2014).

Entre os fatores que mais afetam negativamente a produtividade de feijão comum encontram-se as doenças (GARCÊS-FIALHO et al., 2015). A ocorrência de alguns patógenos na cultura do feijoeiro, mesmo em baixos níveis, pode gerar grandes prejuízos na produção. Destaca-se o fungo *Rhizoctonia bataticola*, causador da podridão radicular. O ataque desse patógeno resulta na morte de plântulas em torno 10-12% nos primeiros 20-30 dias após a semeadura (KUMAR; SHARMA, 2013; KUMAR et al., 2011).

Na cultura do grão de bico (*Cicer arietinum* L.), as plantas com sintoma de podridão radicular apresentam folhas amarelas, sendo que as folhas da parte basal e o caule possuem coloração marrom. A raiz apresenta cor preta, com aspecto de podridão, desprovida das raízes laterais, com presença de estruturas de resistência os escleródios (SHARMA; PANDE, 2013). A podridão cinza do caule é causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Os sintomas da doença iniciam-se com lesões levemente irregulares na haste da planta, deprimidas e escuras, que adquirem coloração cinza, podendo ocorrer clorose, murcha e morte dos ramos ou de toda planta. À medida que as lesões se desenvolvem, pode haver enfraquecimento do caule, resultando em quebra da planta (BIANCHINI, et al., 2005).

Contudo, vários fatores podem influenciar o avanço de doenças, destacando a temperatura, a umidade do solo, além da concentração do inóculo. A eficiência na inoculação de um patógeno é fundamental para avaliar os métodos de manejo, resistência de cultivares e fungicidas aplicados no controle de doenças (OLIVEIRA et al., 2008). Porém, a dificuldade de se obter sementes com diferentes níveis de infecção, tornou a técnica de inoculação de sementes uma importante ferramenta para garantir a reprodução da sintomatologia típica das doenças e ainda possibilitar a sua aplicação em estudos de detecção, patogenicidade, transmissão e melhoramento genético do hospedeiro, controle (TANAKA; MENTEN, 1991).

Estudos com diferentes métodos de inoculação, em condições controladas, têm sido realizados com sucesso em diversas culturas (MEDEIROS et al., 2015; VENTUROSO et al., 2015; GARCIA et al., 2015).

Nesse sentido é fundamental a padronização de metodologias que possibilitem a seleção de forma segura de fontes de resistência à patógenos e a determinação precisa da reação, de resistência ou suscetibilidade dos genótipos avaliados (MEDEIROS et al., 2015).

Diante disso, objetivou-se avaliar a eficiência de métodos de inoculação de *Rhizoctonia bataticola* em sementes de feijão.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Patologia de Sementes, da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, na Universidade Federal de Pelotas, Município de Capão do Leão – RS.

Sementes de feijão cultivar BRS Expedito, safra 2014/15, foram previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1%, seguido de três lavagens rápidas em água esterilizada, e após, foram secas em condição ambiente no laboratório.

Um isolado de *Rhizoctonia bataticola* foi obtido a partir de sementes de feijão com sintoma de infecção. Sementes desinfestadas foram colocadas sobre meio de cultura BDA (Batata, Dextrose e Ágar) e incubadas a 22 °C ± 1 °C por 3 dias, quando o patógeno cresceu sobre as sementes, foi repicado para o meio BDA, até obter-se uma cultura pura.

Os tratamentos foram constituídos de métodos de inoculação em sementes, descritos a seguir:

Método com suspensão de hifas – a inoculação foi realizada com uma suspensão de hifas, obtida a partir da trituração de micélio de *R. bataticola* crescido sobre meio líquido BD (Batata e Dextrose) na proporção de 10 mg de micélio triturado em 100mL de água para cada 300 g de sementes. As sementes permaneceram em contato com a suspensão por 5 minutos, quando foi drenado o excedente de água e mantidas em ambiente estéril, conforme metodologia adaptada de Souza et. Al., (2008).

Método de contato com restrição hídrica - discos com 7 mm de diâmetro, contendo micélio do isolado foram transferidos para placas de Petri de 9 cm contendo meio de cultura BDA modificado (restrição hídrica) com soluto de sacarose no potencial hídrico -0,6 MPa. As placas foram colocadas em câmara de crescimento por quinze dias a temperatura de 20°C ± 1 °C e com fotoperíodo de 12 h até a colônia fúngica atingir o diâmetro total da placa.

Sobre cada placa foram depositadas trinta sementes, distribuídas em fileiras, levemente prensadas sobre o meio. As sementes foram retiradas após 48 h e postas para secar sobre papel filtro em temperatura ambiente, conforme metodologia adaptada de Costa et. Al., (2003). Foram utilizadas quatro placas para cada tratamento.

Inoculação com discos de BDA contendo micélio do fungo - o cultivo do fungo ocorreu em câmara de crescimento com temperatura de 20 °C ± 1°C e fotoperíodo de 12 h durante quinze dias. O meio de cultura utilizado para o crescimento da colônia foi à base de BDA. Para infestação do substrato cinco discos de micélio foram retirados da colônia e depositados em copos plásticos de 200 mL contendo substrato vermiculita autoclavada e previamente umedecida com água destilada e esterilizada, sendo posteriormente acondicionados em sacos plásticos devidamente fechados e em seguida foram levados para a câmara de crescimento por sete dias a temperatura de 20°C ± 1°C e com fotoperíodo de 12 h, conforme metodologia adaptada de Falcão et al., (2005).

Decorrido o procedimento de inoculação do substrato, e das sementes pelo método de contato direto e suspensão de hifas realizou-se a semeadura das sementes de feijão na profundidade de dois cm, em copos plásticos de 200 mL contendo substrato de vermiculita esterilizada. Cada tratamento continha 40 sementes, distribuídas em oito repetições de cinco sementes.

No tratamento controle foi somente adicionada água destilada e esterilizada nas sementes desinfestadas. Os tratamentos foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura de 20 °C ± 1°C e fotoperíodo de 12h, durante quinze dias.

As variáveis avaliadas para a caracterização da qualidade fisiológica foram:

A Emergência (E) foi avaliada aos 10 e 15 dias após a semeadura (DAS), sendo os resultados expressos em porcentagem.

Para o comprimento de parte aérea (CPA) foram feitas duas avaliações, uma aos 10 e outra aos 15 dias após emergência, as plântulas foram mensuradas realizadas do início do caule até o ápice da folha mais nova, com auxílio de uma régua graduada em centímetros, sendo os resultados expressos em cm/plântula.

A Massa seca de parte aérea (MSPA) foi determinada usando as plântulas, provenientes de teste de comprimento de parte aérea, as mesmas foram colocadas em saco de papel e em seguida levadas para estufa na temperatura de 70°C até atingirem peso constante, conforme metodologia adaptada de Nakagawa (1999). Após, as mesmas foram pesadas e os resultados expressos em g/plântula.

A Incidência de doença foi avaliada aos 15 dias após a semeadura, através da observação da existência dos sintomas da doença em folha e caules, sendo os resultados expressos em porcentagem de incidência de sintomas da doença no caule (IC) e em folhas (IF).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo constituído por quatro tratamentos e oito repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias dos tratamentos

comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com o auxílio do software SISVAR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação da emergência aos 10 dias (Tabela 1), pode-se observar que houve diferença significativa entre os métodos de inoculação. As sementes inoculadas pelo método de contato com restrição hídrica tanto aos 10 e 15 dias, reduziram drasticamente a emergência, quando comparadas com os demais métodos. Um dos maiores entraves no desenvolvimento de metodologias na área de patologia de sementes está dificuldade de conseguir sementes infectadas com patógenos em diferentes níveis, para a realização de diversos estudos como a relação patógeno-hospedeiro a partir de sementes (BARROCAS et al., 2014). As técnicas de inoculação de patógenos em sementes, geralmente reduzem consideravelmente o poder germinativo de sementes (VALARINI; MENTEN, 1991).

Em trabalho realizado por Oliveira et al. (2008), com diferentes métodos de inoculação de *Rhizoctonia solani* na cultura da cenoura, também encontrou diferenças entre o método de contato e outros métodos de inoculação, obtendo desempenho inferior nas variáveis analisadas, isso deve-se ao contato direto da semente com o patógeno. O uso da restrição hídrica possibilita um tempo maior de exposição das sementes com o inóculo, porém, sem permitir a germinação das sementes. O tempo de contato das sementes com o patógeno é fundamental para que se obtenham sementes com diferentes níveis de inóculo. Contudo, neste caso, associação do contato direto com a restrição hídrica, foi prejudicial ao estudo, pois reduziu o número de plantas emergidas, dificultando o estudo dos sintomas.

Tabela 1 - Emergência de plântulas, comprimento de parte aérea aos 10 (E10) e 15 (E15) dias após semeadura (DAS) e massa seca de parte aérea (MSPA), em função de diferentes métodos de inoculação de *Rhizoctonia bataticola* em sementes de feijão. Capão do leão/RS, 2016.

Tratamento	E10	E15	CPA10	CPA15	MSPA
	------(%)-----		------(cm)-----		-----(g)----
Tratamento controle	89 a	93 a	13.4 ab	16.0 a	0.094 a
Contato com restrição hídrica	66 b	69 b	9.3 c	10.4 b	0.060 b
Disco de BDA com micélio	89 a	89 a	13.7 a	15.6 a	0.094 a
Suspensão de hifas	91 a	91 a	11.3 bc	12.8 b	0.070 b
Média	83.67	85.48	11.90	13.70	0.079
CV(%)	9.13	9.23	13.41	13.73	13.12

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para comprimento de parte aérea aos 10 dias (Tabela 1), observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos. As sementes inoculadas pelo método de contato com restrição hídrica originaram plântulas com menor comprimento de parte aérea 9,3 cm, quando comparadas com o método de disco de BDA contendo micélio que propiciou plântulas com média de 13,7 cm e o tratamento controle apresentando média de 13,4 cm. O método de suspensão também apresentou desempenho inferior em comparação às sementes inoculadas por disco e tratamento controle. Esses resultados obtidos no comprimento de parte aérea não seguiram a mesma tendência da variável emergência, em que o método por suspensão não foi capaz de reduzir a emergência. Estes resultados demonstram que é possível infectar a semente causando sintomas da doença nas plântulas, porém sem ocasionar morte das mesmas. É

importante ressaltar que um método de inoculação ideal deve garantir a infecção de sementes e manter de forma satisfatória a taxa de germinação, para posterior estudo do patógeno (SOUSA, 2008).

Na avaliação do comprimento de parte aérea aos 15 dias, os tratamentos método de contato com restrição hídrica e suspensão de hifas não diferiram entre si, na qual apresentaram resultados inferiores aos demais tratamentos analisados.

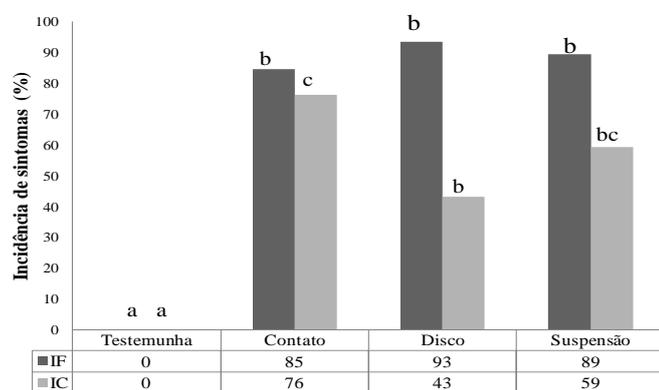
Ainda na Tabela 1 A variável matéria seca também apresentou resultados semelhantes ao comprimento de planta de parte aérea aos 15 dias após emergência. Os métodos de contato com restrição hídrica e suspensão promoveram um maior período de exposição patógeno, influenciando negativamente o crescimento e desenvolvimento das plântulas de feijão. Já o método de disco parece não ter sido eficiente

na infecção do patógeno nas sementes, não diferenciando do tratamento controle, no qual não houve inoculação do fungo. Em trabalho realizado por Falcão et al., (2005) com diferentes metodologias para contaminação do solo com fungos *Sclerotinia* e *Sclerotium rolfsii*, também não foi observado eficiência do método de discos, pois o mesmo não apresentou qualquer efeito negativo no desenvolvimento das plântulas, igualando desempenho do tratamento controle (sem inoculação).

Para a variável incidência de doença em folhas (Figura 1), verificou-se que os diferentes métodos de inoculação foram todos semelhantes entre si diferindo apenas do tratamento controle. Todos os métodos apresentaram um alto percentual de incidência da doença variando de 85 a 93%. As plântulas apresentaram sintomas de murcha e amarelecimento nas folhas, com necrose nas bordas foliares e posteriormente senescência. Esses sintomas são típicos de doenças vasculares, onde patógenos causam danos ao sistema de transporte de seiva bruta, prejudicando a translocação de nutrientes e água absorvidos pela planta (BEDENDO, 1995b).

A maior incidência do sintoma da doença no caule foi constatada em plântulas oriundas de sementes inoculadas pelo método de contato, resultados semelhantes ao teste de emergência, em que esse tratamento obteve menor percentual de emergência. Os sintomas foram observados na região do colo nas plântulas, com aparecimentos de lesões profundas, progredindo para o encolhimento do caule. Doenças que incide em plântulas jovens ou nas sementes que apodrecem quando recém semeadas se classificam no grupo de doenças de “*damping-off*”, mais conhecido como tombamento de plântulas, estes podem reduzir o stand inicial de plantas no campo e conseqüentemente a produção das culturas (BEDENDO, 1995a).

Figura 1 - Incidência de sintomas da doença em folhas (IF) e caule (IC) em função dos diferentes métodos de inoculação de *Rhizoctonia bataticola* em sementes de feijão. Capão do Leão/RS, 2016.



CONCLUSÃO

O método de inoculação por suspensão de hifas é o mais adequado para inoculação de *Rhizoctonia bataticola* em sementes de feijão, visto que proporcionou uma maior incidência de plântulas infectadas sem afetar a emergência.

REFERÊNCIAS

BARROCAS, E. N.; MACHADO, J. C.; ALVES, M. C.; CORRÊA, C. L. Desempenho de sementes de algodão submetidas à deficiência hídrica e presença de *colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Bioscience Journal, v. 30, n. 2, p. 421-428, 2014.

BIANCHINI, A., MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.P.G. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: KIMATI, H., AMORIM, L., REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.) Manual de Fitopatologia. 4 ed. São Paulo: Editora Ceres, 2005. p. 333-349.

BEDENDO, I. P. *Damping-off*. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995a. p. 820- 828.

BEDENDO, I. P. Doenças vasculares. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995b. p. 838-847.

CARVALHO, J. J.; SAAD, J. C. C.; BASTOS, A. V. S.; NAVES, S. S.; SOARES, A. L.; VIDAL, V. M. Teor e acúmulo de nutrientes em grãos de feijão comum em semeadura direta, sob déficit hídrico. Irriga Brazilian Journal of irrigation and drainage, v. 1, n. 1, p.104- 117, 2014.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento safra brasileira de grãos, v. 3 - Safra 2015/16, n. 6 - Sexto Levantamento, mar. 2016. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_03_10_09_17_17_boletim_graos_marco_2016.pdf. Acesso em: 06 mar. 2016.

COSTA M. L. N.; MACHADO J. C.; GUIMARÃES R.M.; POZZA, E. A.; ORIDE, D.; Inoculação de Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. Ciência e Agrotecnologia, v.27, n. 5, p. 1023-1030, 2003.

FALCÃO, J. V.; ORILI, F. P.; ÁVILA, Z. R. de; MELLO, S. C. M. de. Estabelecimento de metodologia para contaminação de solo com propágulos dos fungos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii*, e expressão de doença em soja. Comunicado Técnico. Brasília, 2005.

GARCÊS-FIALLOS, F. R.; GAMARRA-YÁNEZ, H. V.; GARCÊS-ESTRELLA. Doenças e produtividade de genótipos promissores de feijão comum em Quevedo, Equador. Revista Brasileira de Ciências Agrárias, v.10, n.1, p.128-133, 2015.

GARCIA, R. A.; MEYER, M. C.; ÁVILA, K. A. C. B.; CUNHA, M. G. Métodos de inoculação de *Sclerotinia sclerotium* para triagem de cultivares de soja de mofo branco. Pesquisa agropecuária brasileira. v. 50, n.8, p.726-729, 2015.

KUMAR, S.; SHARMA, S.; PATHAK, D. V.; BENIWAL, J. Integrated management of jatropha root rot caused by

- Rhizoctonia bataticola. Journal of tropical forest Science. v. 23, n. 1, p. 35-41, 2011.
- KUMAR, S.; SHARMA S. Metabolites change in *Jatropha* plants due to seed treatment with rhizobacteria and *Rhizoctonia bataticola*. Annals of forest research v. 56, n. 2, p. 389-396, 2013.
- MEDEIROS, A. C.; MELO, D. R. M.; AMBRÓZIO, M. M. Q.; NUNES, G. H. S.; COSTA, J. M. Métodos de inoculação de *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina* em meloeiro (*Cucumis melo*). Summa Phytopathologica, Botucatu, v. 41, n. 4, p. 281-286, 2015.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). Vigor de Sementes: Conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. p. 2.1-2.-24.
- PEREIRA, V. G. C.; GRIS, D. J.; MARAGONI, T.; FRIGO, J. P.; AZEVEDO, K. D.; GRZESIUCK, A. E. Exigências Agroclimáticas para a Cultura do Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Revista Brasileira de Energias Renováveis, v. 3, n.1, p. 32-42, 2014.
- SHARMA, M.; PANDE, S. Unravelling Effects of Temperature and Soil Moisture Stress Response on Development of Dry Root Rot [*Rhizoctonia bataticola* (Taub.)] Butler in Chickpea. American Journal of Plant Sciences. v. 4, n.1, p.584-589, 2013.
- SOUZA, M. V.; MACHADO, J. C.; PHENING, L. H.; KAWASAKI, V. H.; ARAÚJO, D. V.; SILVA, A. A.; MARTINI NETO, A. Métodos de inoculação e efeitos de *fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro. Tropical plant pathology. v. 33, n. 1, p. 041-048, 2008.
- VALARINI, J. P.; MENTEN, J. O. M. Inoculação de sementes de feijão com *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli* e se efeito sobre a qualidade sanitária e germinação. Summa Phytopathologica. v. 17, n. 1, p.227-231, 1991.
- VENTUROSO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; VENTUROSO, L. A. C.; PONTIM, B. C. A REIS, G. F. Inoculação de *Sclerotinia Sclerotium* em sementes de oleoginosas: transmissão e seus efeitos sobre a emergência de plantas. Ciência Rural. v. 45, n. 5, p.788-793, 2015.
- TANAKA, M. A. S. & MENTEN, J. O. M. Comparação de métodos de inoculação de sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii*. Summa Phytopathologica. v. 17, n. 1, p. 219-226, 1991.