

COMUNICAÇÃO

METODOLOGIAS DE INOCULAÇÃO DE *Rhizoctonia solani* NA CULTURA DA CENOURA¹

Inoculation methodology of *Rhizoctonia solani* in carrot

Amanda Cabral Corrêa de Oliveira², Paulo Estevão de Souza³, Edson Ampélio Pozza³,
Felipe de Carvalho Manerba⁴, Maurício Ferreira Lopes⁴

RESUMO

Rhizoctonia solani pode causar diferentes tipos de doenças em cenoura (*Daucus carota* L.). Para a avaliação de métodos de controle geralmente se utiliza inoculação artificial. Objetivou-se neste trabalho, ajustar uma concentração de inóculo de *R. solani* (AG-4) no cultivo de cenoura. Utilizou-se delineamento experimental em blocos ao acaso, com 5 repetições sendo a unidade experimental um vaso de 3L com 40 sementes. Como substrato, utilizou-se solo/areia (3:1). Os tratamentos em esquema fatorial 4 x 3 sendo, 4 densidades de inóculo (9; 18; 36; 72; mg de inóculo·kg⁻¹ de solo) e 3 métodos de infestação artificial (incorporados a todo o solo; incorporados na superfície; contato direto com as sementes) e uma testemunha adicional. O experimento foi conduzido em câmara de crescimento a 20°C, com fotoperíodo de 12 h. As avaliações foram realizadas diariamente do 8º ao 30º dia após a semeadura, registrando-se o estande e o número de plântulas com tombamento. Analisou-se o índice de velocidade de emergência, porcentagem média de tombamento pré e pós emergência. A densidade de 72 mg de inóculo·kg⁻¹ de solo incorporado na superfície foi o método mais eficiente.

Termos para indexação: *Daucus carota*, inóculo, epidemiologia.

ABSTRACT

Rhizoctonia solani may cause different diseases in carrot (*Daucus carota* L.). To test control methods, artificial inoculation is generally employed. This work aimed to adjust a methodology to inoculate *R. solani* (AG-4) in carrot. A randomized block outline with five replicates was used, with an experimental unit of a 3L-pot with 40 seeds and a substrate composed by a mixture of soil/sand (3:1 v/v). Treatments were those in a factorial experiment 4 x 3, with 4 inoculum densities (9; 18; 36; 72 mg of inoculum·kg⁻¹ of soil) and three forms of artificial infestation (incorporated to the substrate as a whole; incorporated on the surface; with direct contact with seeds) and an additional control. The experiment was carried out in a growth chamber at 20°C and a 12h photoperiod. The evaluations were daily performed from the 8th to the 30th day after sowing, recording plant stand and number of seedlings with damping-off. The emergence index, average percentage of pre and post emergence. Were analyzed the density of 72 mg of inoculum·kg⁻¹ of soil, incorporated on the surface of the substrate was the most efficient inoculation method.

Index terms: *Daucus carota*, inoculum, epidemiology.

(Recebido em 9 de março de 2006 e aprovado em 12 de junho de 2007)

A cenoura (*Daucus carota* L.) é considerada suscetível à infecção por *Rhizoctonia solani* Kühn, entretanto, não existem registros quantitativos das perdas. Também não se conhecem cultivares resistentes ao tombamento de plântulas, em razão, principalmente, do complexo de patógenos envolvidos na ocorrência da doença (HENZ & LOPES, 2000). A planta é suscetível, durante todo o ciclo da cultura, apresentando sintomas

desde o tombamento, até a podridão da coroa e o cancro da raiz. No Brasil, são escassos os trabalhos sobre o patossistema *R. solani* e cenoura. Tendo-se como referência trabalhos realizados com outras culturas e/ou em outros países, sob condições edafo-climáticas diferentes das predominantes nas regiões produtoras de cenoura no Brasil, implicando em desconhecimento da biologia e da ecologia do patógeno, aspecto importante para embasar

¹Parte da dissertação do curso de mestrado em agronomia (Fitopatologia), Departamento de Fitopatologia/DFP – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG.

²Mestre – Departamento de Fitopatologia/DFP – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – amandacco@hotmail.com – Bolsista do CNPq

³Doutor, Professor – Departamento de Fitopatologia/DFP – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – pauleste@ufla.br; eapozza@ufla.br

⁴Graduando – Departamento de Fitopatologia/DFP – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – mauricio@agronomo.eng.br; felipemanerba@hotmail.com

estudos sobre medidas de manejo (MICHEREFF FILHO et al., 1996).

Vários fatores podem influenciar o progresso de doenças, entre eles a temperatura, a umidade do solo e a concentração de inóculo. A inoculação eficiente de um patógeno é fundamental para avaliar métodos de manejo, cultivares resistentes e fungicidas aplicados no controle de doenças.

Algumas metodologias são empregadas na tentativa de multiplicar *R. solani* artificialmente. O inóculo é cultivado em substrato como arroz (MICHEREFF et al., 1996), aveia (GOULART, 2002) e outros que apresentam diferentes tempos para colonização, secagem, armazenagem e viabilidade do inóculo. Os estudos também apresentaram modificações na forma de inoculação no solo, diferindo nas densidades de inóculo e na distância do inóculo à semente (MICHEREFF FILHO et al., 1996). Esses autores observaram que concentrações de inóculo entre 50 a 300 mg·kg⁻¹ de solo favoreciam o aumento da incidência do tombamento de plântulas de feijão, principalmente com o aumento da concentração do inóculo, assim como a proximidade do inóculo das sementes aumentava a severidade da doença. Por sua vez, Santos et al. (2005), utilizando a mesma metodologia para a produção do inóculo em grãos de arroz, em estudos para feijoeiro e algodoeiro, encontraram doses satisfatórias em 72 e 144 mg·kg⁻¹ de substrato. Entretanto, os autores utilizaram substrato autoclavado.

Diante disso, objetivou-se ajustar uma concentração de inóculo de *R. solani* em substrato para estudos de tombamento em plântulas de cenoura (*Daucus carota* L.).

Sementes de cenoura da cultivar Juliana foram analisadas quanto à qualidade sanitária e fisiológica inicial do lote de acordo com testes indicados nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992). Estas foram semeadas em sulcos de 2 cm de profundidade em vasos plásticos de 3 litros, contendo o substrato solo/areia (3:1), não esterilizado. Os vasos no plantio foram regados com 695mL de água e recarga de 86mL, a cada 2 dias. O isolado de *R. solani*, pertencente ao grupo de anastomose 4 (AG-4), foi obtido de raízes tuberosas de cenoura, com sintomas de cancro de raiz, procedente de plantio comercial do município de São Gotardo, MG. O preparo do inóculo foi feito pela metodologia descrita por Michereff Filho et al. (1996) com modificações. O inóculo foi obtido a partir de culturas com cinco dias de idade, crescidas em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), sob regime de luz contínua e temperatura de 20°C. Três discos de meio de cultura (9 mm de diâmetro) contendo micélio do patógeno foram transferidos, em ambiente asséptico, para sacos de polietileno de 10x17cm contendo 60 g de arroz pré-cozido e autoclavado (120°C, 30 min, 1 atm), incubados por 8 dias,

em fotoperíodo de 12 horas a 20°C. O arroz colonizado foi acondicionado em saco de papel e seco à sombra, em temperatura ambiente por 96 horas. Posteriormente, esse inóculo constituído de arroz e *R. solani* foi triturado em multiprocessador, peneirado em malha de 0,180 mm e armazenado em saco plástico fechado.

Os tratamentos basearam-se nas densidades de inóculo de 9, 18, 36 e 72 mg de inóculo por kg de solo, com três métodos de infestação artificial do solo: inóculo misturado a 100% do solo que preenchia os vasos (semelhante à infecção natural); inóculo incorporado a 10% de solo, na parte superior do vaso e inóculo adicionado em contato direto com as sementes, antes do plantio (caracterizando sementes infestadas). A testemunha consistiu do plantio de sementes em solo não infestado. O experimento foi conduzido em câmara de crescimento a 20°C, com fotoperíodo de 12 horas.

O delineamento experimental utilizado no ensaio foi o de blocos ao acaso, com esquema fatorial de 4 x 3 (4 densidades e 3 métodos de aplicação) + 1 tratamento adicional, a testemunha, com 5 repetições, sendo a unidade experimental um vaso com 40 sementes.

Avaliaram-se a emergência e o tombamento de plântulas, por meio de inspeções diárias, do oitavo ao trigésimo dia após a semeadura. Para análise dos dados, foi calculado o índice de velocidade de emergência (IVE), calculado pela fórmula proposta por Maguire (1962), sendo: $IVE = \sum_{i=1}^n N_i / D_i$, N_i = número de plântulas germinadas na 1ª contagem, 2ª contagem, ... enésima contagem, respectivamente; D_i = número de dias após semeadura na 1ª contagem, 2ª contagem, ... enésima contagem, respectivamente; porcentagem de tombamento pós-emergência (%TPÓS), onde: %TPÓS = $(100 \times N_t) / X_{et}$, N_t = número de plantas tombadas; X_{et} = média de plântulas emergidas na testemunha; e, por transformação, a porcentagem de plântulas tombadas em pré-emergência (%TPRÉ), onde: %TPRÉ = $[(40 - N_e) \times (\%X_{et})] / 100$, 40 = constante, correspondente ao número de sementes por vaso; N_e = número final de plântulas emergidas; % X_{et} = porcentagem da média de plântulas emergidas na testemunha.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar® (FERREIRA, 2000). As variáveis significativas no teste F foram submetidas ao teste de médias ou análise de regressão. O índice de velocidade de emergência e o tombamento médio de pré-emergência foram comparados pelo teste de Tukey (P £ 5%). Para a porcentagem média de pós-emergência foram analisadas densidades entre métodos de aplicação ajustando-se modelos linear e quadrático.

Para confirmar a identidade do patógeno, plântulas com sintomas de tombamento foram submetidas ao isolamento em meio Ágar-Água para posterior análise morfológica.

A análise fisiológica e sanitária do lote de sementes não detectou *R. solani* e registrou 81% de emergência. As sementes apresentaram alto vigor, pois 70% dessa emergência ocorreu nos primeiros 7 dias da montagem dos 'Blotter test'.

Os métodos de aplicação tiveram efeito significativo de $P = 0,8672$, assim como a testemunha diferiu dos tratamentos com $P = 0,9619$ para índice de velocidade de emergência. A quantidade de inóculo não teve influência significativa na emergência das plântulas. O inóculo adicionado à semente diferiu significativamente dos métodos de aplicação do inóculo adicionado a 100% e 10% do solo, na superfície, com a menor velocidade de emergência média de 3,18 (Tabela 1).

Tabela 1 – Dados médios de índice de velocidade de emergência (IVE), tombamento médio de pré (%TPRÉ) e pós-emergência (%TPÓS) de plântulas de cenoura submetida a três métodos de aplicação do inóculo de *Rhizoctonia solani* AG-4. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Formas aplicação	IVE	%TPRÉ	%TPÓS
Inóculo adicionado a 100% do solo	11,76 a	15,75 b	28,21 b
Inóculo adicionado a 10% do solo na superfície	12,10 a	20,45 b	44,64 a
Inóculo adicionado às sementes	3,18 b	48,13 a	27,86 ab
testemunha	7,52*	21,00*	0,0*

Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($Pd^{*}0,05$).

* Significativo ($P = 0,0463$) Para a variável porcentagem de plântulas com tombamento em pré-emergência, avaliando os métodos de aplicação do inóculo, adicionado a 100% e a 10% do solo, na superfície, foram mais eficientes, diferindo estatisticamente do inóculo adicionado às sementes, que apresentou 48,13% de plântulas tombadas em pré-emergência (Tabela 1).

Para a variável porcentagem de plântulas com tombamento em pré-emergência, os métodos de aplicação do inóculo, adicionado a 100% e a 10% do solo, na superfície, foram mais eficientes, diferindo estatisticamente do inóculo adicionado às sementes, que apresentou 48,13% de plântulas tombadas em pré-emergência (Tabela 1).

Para porcentagem média de tombamento de pós-emergência, houve efeito na interação entre densidade de inóculo e método de aplicação $P = 0,9574$. Os modelos quadráticos e linear foram os de melhor ajuste para o inóculo adicionado a 100 e 10% do solo, respectivamente. Não houve ajuste de modelos polinomiais para o método de aplicação do inóculo adicionados às sementes (Figura 1).

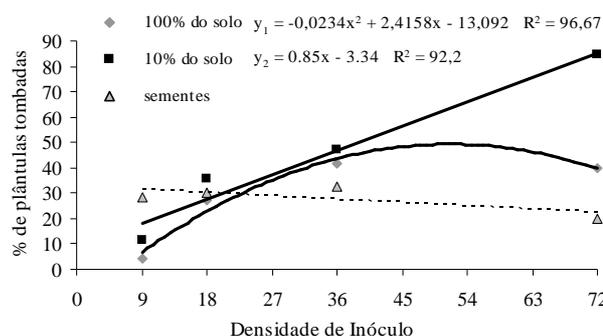


Figura 1 – Porcentagem média de tombamento pós-emergência de plântulas de cenoura inoculadas com *Rhizoctonia solani* AG-4, em quatro densidades de inóculo, por três métodos de aplicação. UFLA, Lavras, MG, 2006.

O método de aplicação do inóculo adicionado às sementes diferiu dos aplicados ao solo, tanto no índice de velocidade de emergência quanto na porcentagem média de tombamento de pré-emergência, em consequência da maior proximidade do inóculo de *R. solani* ao hospedeiro. O fato das sementes estarem semeadas a 2 cm de profundidade também influenciou na intensidade da doença, impedindo a emergência. Relatos da distância e da profundidade do inóculo em relação ao hospedeiro confirmam os resultados encontrados: quanto mais próximo da semente, mais severa a infecção (DIMOND & HORSFALL, 1965, citados por MICHHEREFF FILHO et al., 1996). A semente na fase de germinação absorve maior quantidade de água e seus tecidos ficam tenros, liberando nutrientes que estimulam os microrganismos da rizosfera. Nesta circunstância, há uma maior probabilidade de penetração e colonização do patógeno, ocasionando a podridão de pré-emergência (VALE et al., 2001).

Em estudos realizados por Michereff Filho et al. (1996), para a cultura do feijão, o aumento da intensidade da doença de 32,4 a 84,4%, foi diretamente proporcional ao incremento na densidade de inóculo, de 50 até 300 mg.kg⁻¹ de solo, enquanto que em plântulas de cenoura, apenas 72 mg.kg⁻¹ de solo causou 84,29% de tombamento em pós-

emergência. Essa baixa densidade de inóculo, capaz de causar tombamento em cenoura, é fator preocupante no campo, quando se associa a condições edafo-climáticas ideais e/ou rotação de culturas suscetíveis ao patógeno.

Em outro trabalho desenvolvido com algodão e feijão, por Santos et al. (2005), a densidade de inóculo suficiente para causar sintomas diferenciados entre os tratamentos foi de 72 e 144mg·kg⁻¹ de substrato, respectivamente, causando entre 40 e 50% de intensidade de doença, sendo quantidades de inóculo semelhantes à necessária para causar 84,29% de tombamento em cenoura. Entretanto, os autores utilizaram solo autoclavado, sem a microbiota que poderia competir com o inóculo, e dessa forma as densidades de inóculo foram inferiores às citadas por Michereff Filho et al. (1996).

A variável porcentagem média de tombamento de pós-emergência foi a mais eficiente para avaliar a doença na cultura da cenoura, justificando-se pelo fato das plântulas serem suscetíveis ao patógeno e, portanto, seus tecidos foram completamente lesionados, permitindo apenas avaliações da incidência da doença. Também por esse motivo, não foi possível avaliar a severidade da doença, utilizando-se escala de notas, conforme o tamanho da lesão formada no hipocótilo das plântulas como avaliase em plântulas de feijão e algodão (MICHHEREFF FILHO et al., 1996; SANTOS et al., 2005). Outro fator importante na escolha da porcentagem média de tombamento de pós-emergência, é que as sementes de cenoura são pequenas, dificultando sua recuperação para avaliação precisa do percentual de tombamento de pré-emergência.

É importante considerar, como metodologia para trabalhos na cultura da cenoura, que o melhor resultado não foi o capaz de infectar o maior número de sementes e sim o que causou maior número de tombamento de plântulas em pós-emergência. Isso porque a morte de todas as plântulas não permitiria a comparação visual dos resultados. Dentre as metodologias de inoculação testadas, 72 mg de inóculo, quando aplicada a 10 % do substrato do vaso na camada de 0 a 2 cm, permitiu observar a máxima porcentagem de tombamento de plântulas em pós emergência de cenoura. Assim, essa metodologia pode ser considerada suficiente para estudos de tombamento por *R. solani* em cenoura na fase de plântula.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF, 1992. 365 p.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos, SP. **Programa e Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 235.
- GOULART, A. C. P. Efeito do tratamento de sementes de algodão com fungicidas no controle do tombamento de plântulas causado por *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 4, p. 399-402, jul./ago. 2002.
- HENZ, G. P.; LOPES, C. A. Doenças das Apiáceas. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas: hortaliças**. Viçosa: UFV, 2000. v. 2, p. 447-450.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, Mar./Apr. 1962.
- MICHHEREFF FILHO, M.; MICHHEREFF, S. J.; SILVA, E. B.; ANDRADE, D. E. G. T.; ANTUNES SOBRINHO, S.; NORONHA, M. A.; MARIANO, R. L. R. Influência de tipos de solo do estado de Pernambuco na intensidade da doença induzida por *Rhizoctonia solani* em feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 1, p. 19-25, mar. 1996.
- SANTOS, F. S.; SOUZA, P. E.; OLIVEIRA, C. A.; MAGALHÃES, F. H. L.; LAURENTI, M. A. Ajuste do inóculo de *Rhizoctonia solani* em substrato para estudos de Rizoctoniose em algodoeiro e feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 31, n. 4, p. 373-375, 2005.
- VALE, F. X. R. do; ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W. C. de; VIDA, J. B. Importância do manejo integrado de doenças. In: SILVA, L. H. C. da; CAMPOS, J. R.; NOJOSA, G. B. de A. (Eds.). **Manejo integrado de doenças e pragas em hortaliças**. Lavras: UFLA, 2001. p. 39-90.