



COMUNICADO  
TÉCNICO

263

Teresina, PI  
Setembro, 2021



# Métodos de inoculação de *Sclerotium rolfsii* Sacc. em feijão-caupi

Candido Athayde Sobrinho  
Ananda Rosa Beserra Santos

# Métodos de inoculação de *Sclerotium rolfsii* Sacc. em feijão-caupi<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> *Candido Athayde Sobrinho*, engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Meio-Norte, Teresina, Piauí. *Ananda Rosa Beserra Santos*, engenheira-agrônoma, doutora em Fitopatologia, professora da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí.

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma leguminosa largamente cultivada no mundo, constituindo um alimento básico para a população por ser excelente fonte de proteínas. Tem maioria dos aminoácidos essenciais, carboidratos, vitaminas e minerais, além de grande quantidade de fibras e baixa quantidade de gordura (Freire Filho et al., 2005). No Brasil, na safra 2019/2020, sua produção teve área cultivada de, aproximadamente, 1.307.800 hectares, com produção e produtividade de 712.600 t e 545 kg ha<sup>-1</sup>, respectivamente (Acompanhamento..., 2020), ocorrendo principalmente nas regiões Norte e Nordeste (Freire Filho, 2011).

O interesse pela cultura tem crescido bastante, aumentando consideravelmente sua produtividade devido

à produção com qualidade, o que permite sua aceitação por comerciantes, agroindústrias, distribuidores e consumidores, além do seu preço muito competitivo quando cultivado em safrinha (Freire Filho et al., 2009). Apresenta, porém, limitantes à produtividade (Freire Filho, 2011), devido principalmente às pragas e às doenças que causam danos ao rendimento e à qualidade da produção.

Entre as doenças que acometem a cultura do feijão-caupi, pode-se citar a murcha de esclerócio, causada pelo fungo habitante do solo *Sclerotium rolfsii* Sacc. (Pio-Ribeiro et al., 2016). As perdas ocasionadas por esse patógeno vêm crescendo em grande intensidade, em algumas regiões do Brasil, e são consideradas uma ameaça potencial

(Athayde Sobrinho et al., 2005). O modo de proliferação e persistência de *S. rolfsii* no solo, além de sua diversificada gama de hospedeiros, cerca de 500 espécies botânicas aproximadamente (Hameeda et al., 2010), contribui para grandes perdas econômicas na agricultura (Farooq et al., 2011; Eslami et al., 2015). O fungo atua ocasionando tombamento em plântulas, murcha e podridão radicular.

Apesar da importância econômica da murcha de esclerócio à cultura do feijão-caupi e da necessidade de desenvolvimento de variedades resistentes, há carência de informações sobre um método específico para inoculação do seu agente causal, fase inicial para a realização da seleção para resistência genética. Esse processo visa ao estabelecimento das condições experimentais adequadas à expressão dos sintomas típicos em condições próximas às que ocorrem a campo.

Diferentes autores têm utilizado para outras culturas diversos métodos de inoculação (Garcia et al., 2015; Nogueira et al., 2019). Alguns utilizam processos agressivos, induzindo condições altamente pro-

pícias à infecção pelo patógeno, como deposição de escleródios sobre ou junto às sementes (Nogueira et al., 2019) ou em fermentos provocados nas plantas (Dantas et al., 2002). Outros utilizam fontes ricas em carbono para promover a infestação do solo com inóculo do fungo, induzindo a ocorrência da doença sem causar fermentos (Falcão et al., 2005; Flores-Moctezuma et al., 2006) e a deposição de discos de micélio diretamente no colo da planta (Pratt; Rowe, 2002).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo determinar a forma e a concentração de inóculo mais apropriadas para indução da murcha de esclerócio, sem provocar fermentos em sementes/plantas de feijão-caupi, bem como definir metodologia que possa ser usada para seleção de genótipos resistentes à doença.

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia e em casa de vegetação com temperatura controlada a  $\pm 28$  °C, na Embrapa Meio-Norte, no município de Teresina, Piauí, Brasil.

Os tratamentos foram os seguintes:  
T1- Arroz branco beneficiado e co-

lonizado pelo fungo incorporado ao solo (8 gr L<sup>-1</sup> de solo); T2 – Cinco esclerócios viáveis depositados sobre as sementes imediatamente após a semeadura; T3 – Um grão de arroz integral colonizado pelo fungo depositado sobre a semente; T4 – Um grão de arroz integral colonizado pelo fungo, inserido no colo da planta 21 dias após o plantio; e T5 – Um grão de arroz integral colonizado disposto no centro do vaso e as sementes semeadas equidistantemente. Como contraste, estabeleceu-se um tratamento testemunha absoluta, formado por vasos que continham apenas solo estéril. O isolado utilizado no experimento foi o *Sclerotium rolfsii* 61, obtido no campo experimental da Embrapa Meio-Norte a partir de plantas de feijão-caupi acometidas pela doença e conservado na Micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Meio-Norte pelo método de preservação proposto por Castellani (1967). A cultivar de feijão-caupi utilizada nos experimentos foi a 'BRS Tumucumaque'.

Os grãos de arroz integral foram dispostos em erlenmeyer e esterilizados a 1 atm durante 20 minutos em autoclave vertical; após o res-

friamento, foram depositados sete discos de micélio colonizados pelo isolado em cada erlenmeyer. O conjunto foi mantido em BOD à temperatura de 25 °C e fotofase de 12 horas. Após um período de 7 dias, os grãos já se encontravam totalmente colonizados pelo fungo.

Os grãos de arroz beneficiados foram igualmente dispostos em erlenmeyer, umedecidos com água destilada (1 g de semente para 1 ml de água) e autoclavados a 1 atm por 20 minutos (Serra; Silva, 2005). Após diminuição da temperatura, os grãos foram distribuídos sobre colônias de *S. rolfsii* em placas de Petri, em meio de cultura BDA (batata-dextrose-agar) por um período de 7 dias em BOD a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, os grãos já se encontravam colonizados em sua totalidade. A produção de escleródios foi realizada mediante o cultivo do patógeno a partir de crescimento micelial da colônia em placas de Petri com BDA a 25±1 °C e fotoperíodo de 12 horas durante 20 dias, tempo ideal para produção de escleródios nessas condições.

A inoculação foi realizada no momento da semeadura em todos os

tratamentos, exceto no que se empregou grão de arroz integral inserido no colo das plantas, que foi executado aos 21 dias após o plantio (DAP). Na infestação com arroz beneficiado, esta ocorreu por meio da incorporação e da homogeneização do arroz colonizado ao solo estéril antes do plantio na concentração de 8 gr L<sup>-1</sup> de solo, conforme Barbosa et al. (2010). Para a inoculação com os escleródios, estes, em número de cinco, foram distribuídos sobre a semente, manuseados com auxílio de pinça estéril.

Após a inoculação, foram realizadas duas irrigações/dia e avaliações durante 15 dias, contabilizando-se diariamente as plantas com sintomas de necrose, de constricção no colo, de morte da plântula ou mesmo a não germinação devido à murcha de esclerócio, que foi confirmada individualmente analisando-se cada semente/plântula necrosada e morta.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições, cada repetição constituída por três vasos, que continham três plantas cada. Foram utilizadas 36 plantas por tratamento

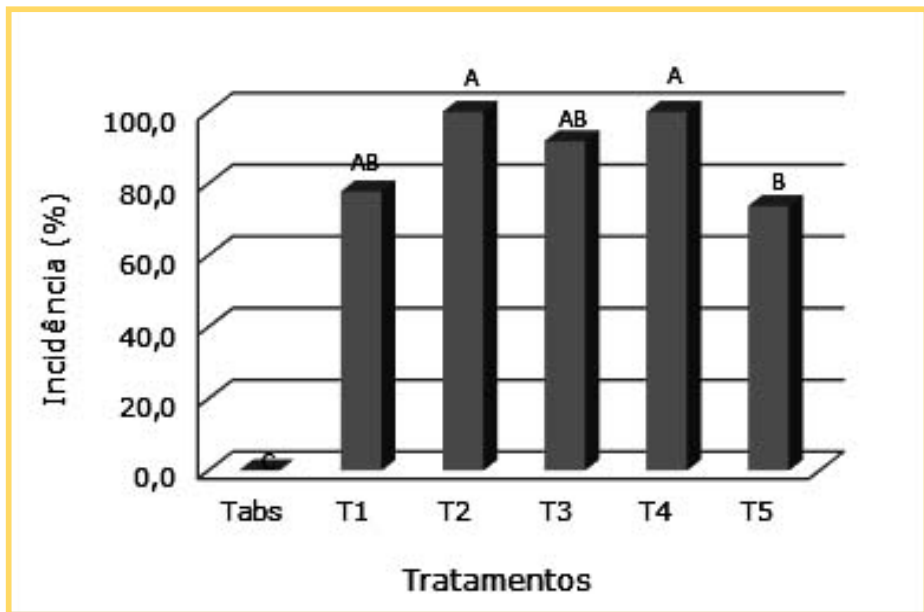
e três plantas por vaso, totalizando 12 vasos por tratamento, e na testemunha o patógeno não foi inoculado. Avaliou-se a incidência média da doença nas plântulas. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias dos dados obtidos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Para tanto, utilizou-se o programa computacional SISVAR (Ferreira, 2011).

Todos os tratamentos revelaram em graus variados a expressão da murcha de esclerócio nas plantas de feijão-caupi. As maiores percentagens de incidência foram obtidas nos tratamentos T2 (cinco esclerócios viáveis colocados no solo junto às sementes), T4 (um grão de arroz infestado junto à semente), T1 (8 gr L<sup>-1</sup> de arroz beneficiado misturado ao solo) e T3 (um grão de arroz integral inserido no colo das plantas 21 DAP), os quais se mostraram semelhantes ( $p < 0,05$ ) entre si. Esses métodos diferiram daquele que empregou um grão de arroz integral colonizado pelo fungo disposto no centro do vaso (T5), que apresentou o menor valor de incidência (Figura 1), porém todos

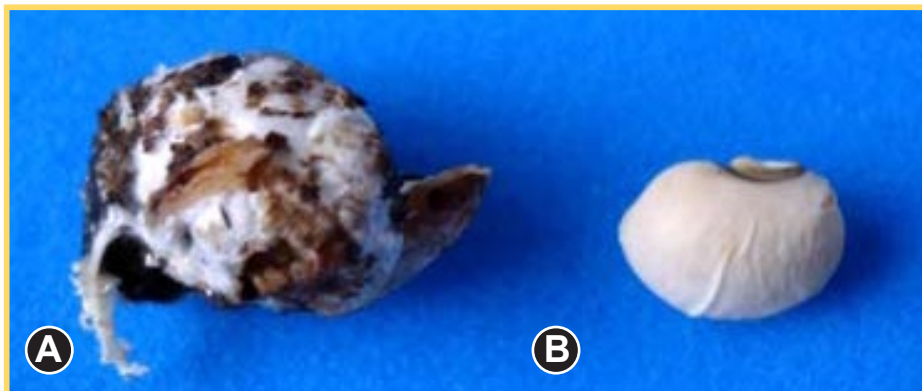
eles diferiram da testemunha (sem inoculação).

Nos tratamentos T2 e T4, observou-se incidência de 100%, nos tratamentos T2 e T3, incidência de 92%; na maioria das vezes, as plantas nem chegaram a emergir em função da excessiva pressão do inóculo, tanto sobre as sementes em

germinação, quanto nas plântulas emergidas (Figura 2). Tais resultados corroboram os obtidos por Falcão et al. (2005), ao avaliarem métodos de inoculação em soja, em que as maiores mortalidades foram verificadas, quando a contaminação do solo se deu por meio de grãos de arroz colonizados pelo fungo.



**Figura 1.** Incidência média de murcha/podridão de esclerócio (*Sclerotium rolfsii*) em plântulas de feijão-caupi cultivar BRS Tumucumaque submetidas a cinco métodos de inoculação. Tabs = Testemunha absoluta; T1 = arroz branco beneficiado e colonizado distribuído no solo do vaso (8 gr L<sup>-1</sup> de solo); T2 = cinco esclerócios viáveis sobre cada semente; T3 = um grão de arroz integral colonizado sobre cada semente; T4 = um grão de arroz integral colonizado e inserido no colo; T5 = um grão de arroz integral colonizado colocado no centro do vaso. Letras iguais na horizontal (acima das colunas) indicam que os tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2.** Severidade nos sintomas causados por *Sclerotium rolfsii* em plântulas de feijão-caupi cultivar BRS Tumucumaque submetidas à inoculação pelos métodos T2 (cinco esclerócios viáveis sobre cada semente) e T3 (um grão de arroz integral colonizado pelo fungo sobre cada semente). Plântula totalmente necrosada (A); semente normal antes de germinar (B).

Por sua vez, o método em que um grão de arroz integral colonizado foi inserido no colo das plantas aos 21 DAP, com incidência de 100%, também se mostrou bastante agressivo, matando as plantas em aproximadamente 15 dias após a inoculação. Esses resultados estão em desacordo com os de Medeiros et al. (2015), que definiram essa metodologia como a que melhor expressou a rizoctoniose do meloeiro, sendo a mais adequada para seleção de genótipos resistentes. Quando os grãos beneficiados de arroz colonizados pelo fungo ( $8 \text{ gr L}^{-1}$ ) foram misturados ao solo dos vasos (T1),

verificou-se um nível de incidência da ordem de 78%, revelando ser também um bom método para reproduzir a expressão da doença em plantas de feijão-caupi. Resultados semelhantes foram encontrados por Barbosa et al. (2010), ao avaliar métodos de inoculação com *S. rolfsii* em plantas de tomate.

O método que empregou um grão de arroz colonizado no centro do vaso (T5), assim como o T1, mostrou-se menos agressivo às plantas, cuja característica é requerida para o patossistema feijão-caupi versus *S. rolfsii* por possibilitar melhor expressão da resistência das



plantas ao patógeno. Com efeito, tais métodos parecem emular o que ocorre naturalmente na patogênese, à medida que o agente causal, lançando suas estruturas no solo, intercepta naturalmente as partes vegetais suscetíveis, causando a doença. Essas observações estão de acordo com as de Falcão et al. (2005), quando indicaram o uso de arroz como substrato de crescimento para *S. rolfsii* e como veículo de inóculo para infestação de solo em ensaios de fontes de resistência para a cultura da soja.

Conforme destacado anteriormente, os demais métodos aqui testados, por serem bastante agressivos, determinam, em muitos casos, a morte das plântulas (Figura 2 A) logo no início do processo germinativo, fase em que as plantas são bastante sensíveis ao ataque do patógeno. Em tais condições, pode-se, ao usar métodos mais agressivos, contribuir para, erroneamente, selecionar como susceptíveis genótipos que possam apresentar relativo grau de resistência, pela excessiva pressão da doença nas fases iniciais de desenvolvimento das plantas.

Embora, em alguns patossistemas, sejam requeridas, para seleção de fontes de R, altas densidades de inóculo no entorno das plantas (Yaqub; Shahzad, 2005), isso não foi observado no presente estudo, conforme discutido acima, fato que corrobora os dados obtidos por Falcão et al. (2005), que indicam o uso de arroz como substrato para o cultivo de *S. rolfsii* e veiculação de inóculo para infestação de solo, no qual o arroz beneficiado foi o único substrato que proporcionou incidência da doença em tomateiro, sem causar ferimentos nas plantas.

A etapa seguinte a este estudo consistirá em validar as metodologias sobre genótipos de feijão-caupi, verificando sua aplicabilidade quanto à seleção de materiais resistentes, uma vez que sua capacidade de causar doença está estabelecida.

As metodologias baseadas em (i) infestação do solo com um grão de arroz integral colonizado disposto no centro do vaso e (ii) um grão de arroz infestado junto às sementes são as mais apropriadas à inoculação de *Sclerotium rolfsii*, capazes de causar sintomas de murcha de esclerócio em plantas de feijão-caupi.



# Referências

ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA [DE] GRÃOS: safra 2020/21: terceiro levantamento, v. 8, n. 3, p. 12-14, dez. 2020.

ATHAYDE SOBRINHO, C.; VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A. dos. Doenças fúngicas e bacterianas. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. de A.; RIBEIRO, V. Q. (ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2005. cap. 12, p. 461-484.

BARBOSA, R. N. T.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. L.; SOUZA, G. R. Método de inoculação de *Sclerotium rolfsii* em tomateiro. **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 4, n. 1, p. 49-52, 2010

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 8, p. 181-184, 1967.

DANTAS, S. A. F.; OLIVEIRA, S. M. A.; COELHO, R. S. B.; SILVA, R. L. X. Identificação de fontes de resistência em feijoeiro a *Sclerotium rolfsii*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 5, p. 528-531, set./out. 2002.

ESLAMI, A. A.; KHODAPARAST, S. A.; MOUSANEJAD, S.; DEHKAEI, F. P. Evaluation of the virulence of *Sclerotium rolfsii* isolates on *Arachis hypogaea* and screening for resistant genotypes in greenhouse conditions. **Hellenic Plant Protection Journal**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2015.

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**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 9 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado técnico, 135).

FAROOQ, M. A.; IQBAL, U.; RASOOL, A.; ZUBAIR, M.; IQBAL, S. M.; AHMAD, S. Evaluation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) genotypes for resistance against root rot caused by *Sclerotium rolfsii*. **Mycopath**, v. 9, n. 1, p. 13-15, 2011.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FLORES-MOCTEZUMA, H. E.; MONTESBELMONT, R.; JIMENEZ-PEREZ, A.; NAVA-JUAREZ, R. Pathogenic diversity of *Sclerotium rolfsii* isolates from Mexico, and potential control of southern blight through solarization and organic amendments. **Crop Protection**, v. 25, n. 3, p. 195-201, 2006.

FREIRE FILHO, F. R. (ed.). **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 84 p.

FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. de A.; RIBEIRO, V. Q. (ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2005. 519 p.

FREIRE FILHO, F. R.; ROCHA, M. de M.; RIBEIRO, V. Q.; SILVA, K. J. D. e; NO-

GUEIRA, M. do S. da R. Melhoramento genético e potencialidades do feijão-caupi no Brasil. In: CONGRESSO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI, 2., 2009, Belém, PA. **Da agricultura de subsistência ao agronegócio**: anais. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2009. p. 120-135. 1 CD-ROM.

GARCIA, R. A.; MEYER, M. C.; ÁVILA, K. A. G. B.; CUNHA, M. G. da. Métodos de inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* para triagem de cultivares de soja resistentes ao mofo-branco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 8, p. 726-729, 2015.

HAMEEDA, B.; HARINI, G.; RUPELA, O. P.; KUMAR RAO, J. V. D. K.; REDDY, G. Biological control of chickpea collar rot by co-inoculation of antagonistic bacteria and compatible rhizobia. **Indian Journal Microbiol**, v. 50, n. 4, p. 419-424, 2010.

MEDEIROS, A. C.; MELO, D. R. M.; AMBRÓSIO, 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**, v. 41, n. 4, p. 281-286, 2015.

NOGUEIRA, G. A.; SILVA, S. G. A.; LINHARES, C. M. S.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; NUNES, G. H. S. Métodos de inoculação de *Fusarium solani* e *Sclerotium rolfsii* em meloeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 45, n. 1, p. 59-63, 2019.

OLIVEIRA, I. J. de; KANO, C.; FONTES, J. R. A.; DIAS, M. C. **Produtividade de feijão-caupi no Amazonas em função de doses de fósforo e potássio**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2015. 6 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Circular técnica, 50).

PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS FILHO, F. M.; ANDRADE, G. P. Doenças do feijão-caupi, In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (ed.). **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. v. 2, cap. 38.

PRATT, R. G.; ROWE, D. E. Enhanced resistance to *Sclerotium rolfsii* in populations of alfalfa selected for quantitative resistance to *Sclerotinia trifoliorum*. **Phytopathology**, v. 92, n. 2, p. 204-209, 2002.

SERRA, I. M. R. S.; SILVA, G. S. Caracterização biológica e fisiológica de isolados de *Sclerotium rolfsii* obtidos de pimentão no Estado do Maranhão. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 61-66, jan./fev. 2005.

YAQUB, F.; SHAHZAD, S. Pathogenicity of *Sclerotium rolfsii* on different crops and effect of inoculum density on colonization of mungbean and sunflower roots. **Journal of Botany**, v. 37, n. 1, p. 175-180, 2005.

Exemplares desta edição  
podem ser adquiridos na:

**Embrapa Meio-Norte**

Av. Duque de Caxias, 5.650,  
Bairro Buenos Aires,  
Caixa Postal 01  
CEP 64008-780, Teresina, PI  
Fone: (86) 3198-0500  
Fax: (86) 3198-0530  
[www.embrapa.br/meio-norte](http://www.embrapa.br/meio-norte)  
Sistema de atendimento ao Cliente(SAC)  
[www.embrapa.br/fale-conosco/sac](http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac)

**1ª edição** (2021): formato digital



Comitê Local de Publicações  
da Unidade Responsável

Presidente

*Rosa Maria Cardoso Mota de Alcantara*

Secretário-Executivo

*Jeudys Araujo de Oliveira*

Membros

*Lígia Maria Rolim Bandeira, Edvaldo Sagrilo,  
Orlane da Silva Maia, Luciana Pereira dos  
Santos Fernandes, Francisco José de Seixas  
Santos, Paulo Henrique Soares da Silva, João  
Avelar Magalhães, Paulo Fernando de Melo  
Jorge Viêira, Alexandre Kemenes, Ueliton  
Messias, Marcos Emanuel da Costa Veloso,  
José Alves da Silva Câmara*

Supervisão editorial

*Lígia Maria Rolim Bandeira*

Revisão de texto

*Francisco de Assis David da Silva*

Normalização bibliográfica

*Orlane da Silva Maia (CRB-3/915)*

Diagramação

*Jorimá Marques Ferreira*

Foto da capa

*Candido Athayde Sobrinho*