

USO DE TETRAZÓLIO NA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E DA SOBREVIVÊNCIA EM SOLO DE ESCLERÓDIOS DE *Sclerotium rolfsii*

Giselle Raquel de Souza PEREIRA¹; Rosalee Albuquerque Coelho NETTO²

¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Orientadora CPCA /INPA

1. Introdução

Sclerotium rolfsii Sacc. infecta cerca de 600 espécies vegetais, em mais de 100 famílias botânicas. Causa podridão no colo das plantas, impedindo a circulação da seiva e, na parte aérea, o sintoma se caracteriza por amarelecimento das folhas e murcha. É uma doença importante para diversas espécies olerícolas no Amazonas (Lourd, 1993). *Sclerotium rolfsii* sobrevive no solo por até cinco anos, por meio de estruturas de resistência chamadas de escleródios (Kimati *et al.*, 1997).

E as estratégias de manejo desta doença visam, principalmente, a diminuição da população de escleródios no solo seja por métodos químicos, biológicos (Ristaino *et al.*, 1996), físicos e culturais (Punja, 1985). Fatores externos bióticos e abióticos podem afetar a sobrevivência dos escleródios. O tempo de sobrevivência dessas estruturas no ambiente tem grande importância, principalmente quando se utiliza rotação de culturas para o manejo da doença.

A viabilidade de escleródios de *Sclerotium rolfsii* geralmente é avaliada cultivando-se os escleródios em meio de cultura, no entanto, este método permite o crescimento de contaminantes que dificultam a avaliação e podem impedir a germinação de escleródios viáveis. O cloreto de tetrazólio é um popular indicador da viabilidade de sementes e o teste se baseia na alteração da coloração dos tecidos vivos pela ação de enzimas que reduzem o tetrazólio a formazam, que possui coloração avermelhada. Tecidos inviáveis não reagem com a solução de tetrazólio e, portanto, mantêm a sua coloração natural (Aarestrup *et al.*, 2008).

Apesar de a podridão de escleródio ser uma doença comum em hortaliças no Amazonas, não se conhece o tempo de sobrevivência desse fungo em condições naturais na Amazônia. O presente trabalho teve como objetivos, avaliar a utilização do cloreto de tetrazólio como um indicador da viabilidade de escleródios de *S. rolfsii* e a sobrevivência desse fungo em um alissolo no Amazonas utilizando cloreto de tetrazólio e cultivo em meio de cultura.

2. Material e Métodos

O trabalho foi realizado no laboratório de Fitopatologia e na Estação Experimental Alejo van der Pahlen do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, em Manaus.

Para avaliação do uso do cloreto de tetrazólio na indicação da viabilidade de escleródios de *S. rolfsii* Escleródios produzidos em fatias de cenoura autoclavadas foram distribuídos em tubos plásticos para microcentrifuga (capacidade de 1,5 mL), na proporção de 30 escleródios por tubo, constituindo a unidade experimental. Metade dos escleródios foram inativados mantendo-se os tubos abertos e expostos a vapor de paraformaldeído, durante 24 horas, em um dessecador. Metade dos escleródios foi mantida, pelo mesmo período, em uma atmosfera sem paraformaldeído (testemunha - não inativados). Após esse tratamento, 1 mL de solução de cloreto de tetrazólio, nas concentrações de 0%, 0,01%, 0,1% e 1%, preparadas em tampão fosfato (Dawson *et al.*, 1991) nos pHs de 6,0; 6,5; 7,0; e 7,5, foi vertido sobre os escleródios nos tubos. Para cada tratamento foram preparadas três repetições e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

Após a incubação por 24 horas em estufa a 35 °C, sem luz, os escleródios foram seccionados ao meio com o auxílio de pinça e bisturi. A coloração interna de 25 escleródios em cada tratamento foi avaliada sob microscópio estereoscópico e calculada a média do número de escleródios com as diversas colorações.

Para a avaliação da sobrevivência de *S. rolfsii* em solo, escleródios produzidos em fatias de cenoura autoclavadas foram distribuídos em sacos de nylon (8 x 10 cm), na proporção de 30 escleródios por saco, que se constituiu na unidade experimental.

Os sacos com os escleródios foram dispostos em campo, em solo agrícola, na Estação Experimental de Hortaliças do INPA em um experimento em delineamento em blocos casualizados com cinco repetições. Os tratamentos avaliados foram: 1) escleródios na superfície do solo ou enterrados a 20 cm de profundidade; 2) avaliação da viabilidade dos escleródios por meio do cultivo em meio de cultura BDA ou utilizando solução de cloreto de tetrazólio e 3) dias no solo (zero, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180). Os sacos contendo os escleródios foram dispostos no campo com um espaçamento de 1 x 1 m e os sacos com os escleródios enterrados foram localizados abaixo dos sacos na superfície.

Nas épocas de avaliação os sacos correspondentes aos tratamentos foram coletados, lavados em água corrente desinfestados em solução de etanol 70% e de hipoclorito de sódio a 0,5%, abertos com uma tesoura flambada e os escleródios distribuídos sobre meio de cultura BDA acrescido de 50 mg L⁻¹ de cloranfenicol ou foram transferidos para microtubos de centrifuga onde foi adicionado 1 mL de solução de tetrazolium 1%, pH 7. Os escleródios distribuídos em meio de cultura foram observados diariamente e aqueles que apresentaram crescimento micelial foram considerados vivos (viáveis). Os que não apresentaram crescimento micelial, até cinco dias após a transferência para o meio de cultura, foram considerados mortos (inviáveis). Os escleródios tratados com solução de tetrazólio foram, após 24 horas de incubação a 35 °C, no escuro, seccionados e a coloração interna anotada. Com os dados de percentual de sobrevivência foram elaboradas curvas de sobrevivência dos escleródios no tempo e calculadas as áreas abaixo das curvas de sobrevivência de escleródios (AACSE) para cada tratamento (Campbell e Madden, 1990). Os dados de AACSE submetidos a análise de variância utilizando o programa SAEG, versão 9.0. (Ribeiro Júnior e Melo, 2009).

3. Resultados e Discussão

Na avaliação da viabilidade dos escleródios com cloreto de tetrazólio constatou-se que com todos os pHs testados (6,0; 6,5; 7,0 e 7,5) e concentrações de tetrazólio (0%, 0,01%, 0,1% e 1%) foi possível distinguir escleródios vivos dos mortos pela coloração interna. Os escleródios viáveis apresentam coloração interna rosa ou bege (sua coloração natural) e os não viáveis, marrom.

Dos escleródios tratados com paraformaldeído, 98,2% apresentaram coloração marrom. Entre os escleródios não tratados com paraformaldeído (vivos) apenas 2,5% apresentaram coloração marrom, 54,9% apresentaram coloração bege e 42,5% apresentaram coloração rosa. A medida que a concentração de tetrazólio aumentou, a proporção de escleródios com coloração interna rosa também aumentou, entre os não tratados com paraformaldeído. No tratamento com pH 7,0 e concentração de 1% de tetrazólio todos os escleródios não tratados com paraformaldeído (vivos), apresentaram coloração rosa (Tabela 1) e todos os tratados com paraformaldeído apresentaram coloração interma marrom, permitindo uma distinção clara entre escleródios vivos e os mortos, semelhante a coloração observada em sementes viáveis (Aarestrup *et al.*, 2008).

No campo, foram realizadas 11 avaliações da sobrevivência dos escleródios. A viabilidade diminuiu com o tempo (Figura 1) sendo a diminuição mais acentuada nos escleródios da superfície do solo. A sobrevivência dos escleródios enterrados foi significativamente superior a sobrevivência dos que permaneceram na superfície do solo (Figura 2). Nos escleródios enterrados a viabilidade atingiu, em média, 69,6% enquanto nos escleródios da superfície, atingiu 27,3% aos 182 dias.

Não houve diferença entre os métodos de avaliação da viabilidade (cultivo em BDA ou com solução de tetrazólio) (Figura 2) indicando a possibilidade do uso de solução de cloreto de tetrazólio na avaliação da sobrevivência de *S. rolfsii* em condição de campo. A avaliação com tetrazólio foi mais rápida sendo possível, em 24 h obter o percentual de sobrevivência além de não apresentar contaminantes que pudessem dificultar a avaliação. Apesar de os escleródios serem estruturas adaptadas para sobreviverem a condições adversas, temperaturas acima de 15 °C diminuem a sobrevivência enquanto que baixa umidade (Beute e Rodriguez-Kábana, 1981) e falta de competição com outros organismos favorece a sobrevivência (Willems, 2008). Apesar de os solos da Amazônia apresentarem condições que contribuiriam com a baixa sobrevivência dos escleródios de *S. rolfsii* (alta temperatura e alta umidade), a sobrevivência dessas estruturas permaneceu alta mesmo após seis meses (180 dias) de exposição ao ambiente. Arações do solo que exponham os escleródios enterrados aos agentes ambientais como radiação solar, dessecação, temperatura elevada podem, provavelmente, auxiliar na diminuição da população do fungo no solo e contribuir no manejo da doença.

Tabela 1. Coloração interna de escleródios de *Sclerotium rolsii* (%) tratados ou não com paraformaldeído, após 24 horas de imersão em solução de cloreto de tetrazólio em diferentes concentrações (CT) e pHs.

CT (%) ¹	Trat. ²	pH ³											
		6,0			6,5			7,0			7,5		
		Coloração dos escleródios (%) ⁴											
	MR	BG	RS	MR	BG	RS	MR	BG	RS	MR	BG	RS	
0	Inativ	100	0	0	93,3	6,7	0	98,7	1,3	0	98,7	1,30	0
	Test	0	100	0	18,7	81,3	0	1,3	98,7	0	12	88	0
0,01	Inativ	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
	Test	1,3	98,7	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0
0,10	Inativ	94,7	5,3	0	94,7	5,3	0	98,7	1,3	0	97,3	2,7	0
	Test	0	16	84	0	5,3	94,7	4	2,7	93,3	2,7	73,3	24
1,00	Inativ	100	0	0	100	0	0	100	0	0	94,7	5,3	0
	Test	0	13,3	86,7	1,3	1,3	97,3	0	0	100	0	0	100

¹ Concentração de tetrazólio na solução preparada em tampão fosfato;

² Tratamento dos escleródios: Inativado = escleródios expostos durante 24 h a atmosfera saturada com vapor de paraformaldeído em dessecador e testemunha = escleródios não expostos ao paraformaldeído;

³ pH da solução de cloreto de tetrazólio (preparada em tampão fosfato);

⁴ coloração interna dos escleródios seccionados após 24 horas de imersão em solução de cloreto de tetrazólio a 35 °C sem luz., média de três repetições de 25 escleródios; MR = marrom, BG = Bege; RS = Rosa.

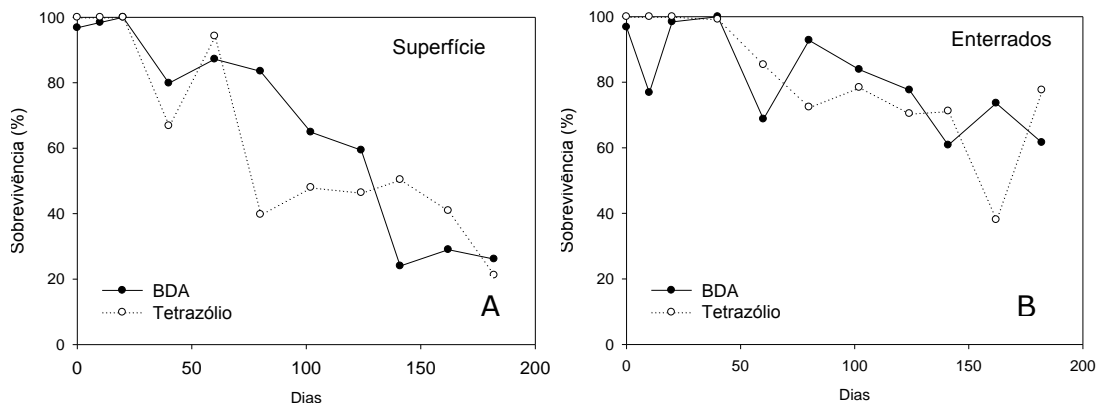


Figura 1. Sobrevivência de escleródios de *Sclerotium rolsii* na superfície do solo ou enterrados a 20 cm de profundidade, durante 180 dias, avaliada em meio BDA e com solução de tetrazólio (1%, pH 7), média de cinco repetições.

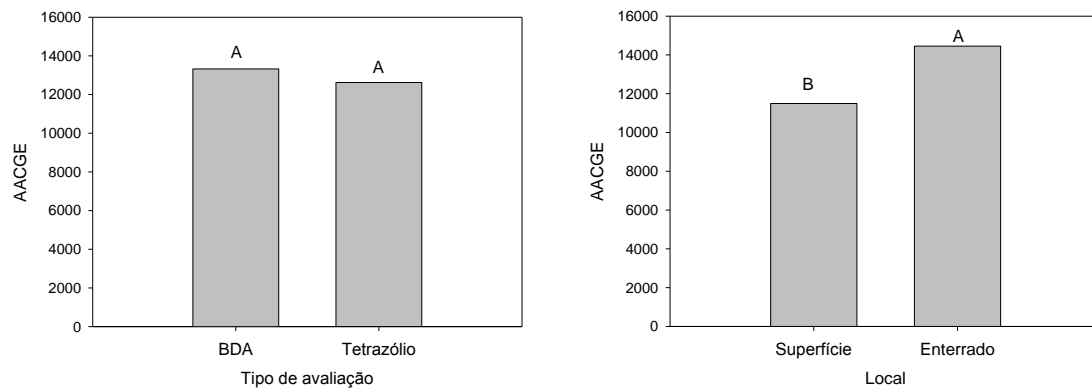


Figura 2 - Áreas abaixo da curva de germinação de escleródios (AACGE) de *Sclerotium rolfsii* em função do tipo de avaliação (BDA e tetrazólio) e do local (superfície e enterrados).

4. Conclusão

O cloreto de tetrazólio na concentração de 1% e pH 7 foi eficiente na discriminação de escleródios viáveis e não viáveis de *S. rolfsii* e pode ser utilizado para avaliação da viabilidade deste fungo em estudos de campo. A avaliação da sobrevivência utilizando o cultivo em BDA ou a solução de tetrazólio foi similar, sendo, no entanto, os resultados obtidos com o segundo método obtidos de forma mais rápida.

A sobrevivência de *S. rolfsii* em solo, apesar de decrescer com o tempo, permaneceu alta durante os seis meses de avaliação, principalmente nos escleródios enterrados indicando que provavelmente os fatores ambientais como vento, radiação solar, temperatura elevada afetam a sobrevivência dessas estruturas enquanto que os escleródios enterrados permanecem viáveis por mais tempo.

5. Referências

- Aarestrup, J.R.; Karam, D.; Corrêa, E.J.A.; Fernandes, G.W. 2008. Análise da viabilidade de sementes de *Euphorbia heterophylla*. *Planta Daninha* 26: 515-519.
- Beute, M. K.; Rodríguez-Kabana, R. 1981. Effects of soil moisture, temperature, and field environment on survival of *Sclerotium rolfsii* in Alabama and North Carolina. *Phytopathology*, 71: 1293-1296.
- Campbell, C.L.; Madden. L.V. 1990 *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. John Wiley & Sons, New York City. 532 p.
- Dawson, R.M.C.; Elliot, D.C.; Elliot, W.H.; Jones, K.M. 1991. *Data for Biochemical Research*. Carendon Press, Oxford, 580.
- Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A.; Rezende, J.A.M. 1997. *Manual de Fitopatologia*. 3 ed, Ceres, São Paulo. p. 715-716.
- Lourd, M.1993. Os principais patógenos das plantas cultivadas na Ilha do Careiro. *Amazoniana*, 12:565-576.
- Punja, Z.K. 1985. The biology, ecology, and control of *Sclerotium rolfsii*. *Annual Review of Phytopathology*, 23: 97-127.
- Ribeiro Júnior, J.I.; Melo, A.L.P. 2009. *Guia prático para utilização do SAEG*. UFV, Viçosa. 287 p.
- Ristaino, J.B.; Perry, K.B.; Lumsden, R.D. 1996. Soil solarization and *Gliocladium virens* reduce the incidence of southern blight (*Sclerotium rolfsii*) in bell pepper in the field. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 583-593.
- Willems, H. J. 2008. The survival of fungal sclerotia under adverse environmental conditions. *Biological Reviews*, 46: 387-407.