

LAUDIANE ÉRICA LEITE

**DETECÇÃO DE *Rhizoctonia solani* E *Sclerotinia sclerotiorum* EM
SEMENTES DE FEIJÃO POR MEIO DA TÉCNICA DE AMPLIFICAÇÃO
ISOTÉRMICA MEDIADA POR LOOP (LAMP) E REDUÇÃO DA VIABILIDADE
DE ESCLERÓDIOS DE *S. sclerotiorum* PELO MÉTODO DE
DESINFESTAÇÃO ANAERÓBICA DO SOLO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa –
Campus Rio Paranaíba, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Agronomia - Produção
Vegetal, para a obtenção do título de
Magister Scientiae.

Orientador: Everaldo Antônio Lopes

Coorientador: Geraldo Humberto Silva

**RIO PARANAÍBA - MINAS GERAIS
2019**

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Campus Rio Paranaíba
UFV

T

L533d Leite, Laudiane Érica, 1989-
2019 Detecção de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão por meio da técnica de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) e redução da viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum* pelo método de desinfestação anaeróbica do solo / Laudiane Érica Leite. – Rio Paranaíba, MG, 2019.

45 f. ; 29 cm.

Orientador: Everaldo Antônio Lopes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Controle de doenças de plantas. 2. Desinfestação biológica do solo. 3. Diagnose de doenças de plantas. 4. Mofo branco. 5. *Phaseolus vulgaris*. I. Universidade Federal de Viçosa. Instituto de Ciências Agrárias. Mestrado em Agronomia. Produção Vegetal. II. Título.

635.652

LAUDIANE ÉRICA LEITE

**DETECÇÃO DE *Rhizoctonia solani* E *Sclerotinia sclerotiorum* EM
SEMENTES DE FEIJÃO POR MEIO DA TÉCNICA DE AMPLIFICAÇÃO
ISOTÉRMICA MEDIADA POR LOOP (LAMP) E REDUÇÃO DA VIABILIDADE
DE ESCLERÓDIOS DE *S. sclerotiorum* PELO MÉTODO DE
DESINFESTAÇÃO ANAERÓBICA DO SOLO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa –
Campus Rio Paranaíba, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Agronomia - Produção
Vegetal, para a obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 10 de dezembro de 2019.

Assentimento:



Laudiane Érica Leite

Autora



Everaldo Antônio Lopes

Orientador

Aos meus pais Zilda e Amarildo, pelo apoio incondicional e confiança depositada.

Aos meus irmãos Layane e Ruan pela motivação.

Ao meu avô e a Congregação Obra de Restauração pelas orações.

A minha princesa Ana Cecília.

A todos vocês...

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar forças para prosseguir e não me deixar desistir nos momentos difíceis!

Agradeço aos meus pais por compartilharem deste sonho e por terem lutado tanto para torná-lo realidade, por serem o alicerce da minha vida!

À minha irmã pelo apoio incondicional!

Aos meus avós pelas orações!

Aos familiares por torcerem pelo meu sucesso!

À Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Rio Paranaíba pela oportunidade.

Ao meu orientador, Professor Everaldo Antônio Lopes, pela realização do trabalho, confiança e presteza sempre.

Aos meus colegas de laboratório BIOFITOMOL pelo auxílio.

As minhas amigas e colegas de graduação Sinara e Ane Gabrielle pela ajuda.

Aos demais professores da minha pós-graduação por compartilharem seus vastos conhecimentos!

Aos avaliadores deste trabalho pela disponibilidade e presteza!

A todos que me ajudaram ao longo desta trajetória árdua, porém gloriosa!

Agradeço o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UFV (PPG) pelas ajudas financeiras.

Muito obrigada!

“Melhor é o fim das coisas do que o princípio delas...”

Eclesiastes 7: 8

RESUMO

LEITE, Laudiane Érica, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2019. **Detecção de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão por meio da técnica de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) e redução da viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum* pelo método de desinfestação anaeróbica do solo.** Orientador: Everaldo Antônio Lopes. Coorientador: Geraldo Humberto Silva.

Sclerotinia sclerotiorum e *Rhizoctonia solani* causam prejuízos significativos à cultura do feijão. Esses fungos sobrevivem no solo na forma de escleródios e são dispersos a longa distância por meio de sementes. A detecção acurada de patógenos em sementes e a redução da viabilidade de estruturas de sobrevivência de fungos no campo podem contribuir para redução de perdas agrícolas. As hipóteses principais deste trabalho foram que a técnica de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) poderia ser usada para detecção de *S. sclerotiorum* e *R. solani* em sementes de feijão e que o método de desinfestação anaeróbica do solo (DAS) reduziria a viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum* no campo. No Capítulo 1, objetivamos validar o protocolo de detecção de *R. solani* e *S. sclerotiorum* em sementes de feijoeiro comum por LAMP. Lotes de sementes livres desses patógenos, de sementes naturalmente infectadas e artificialmente infectadas foram usadas para validação da técnica. *Rhizoctonia solani* foi detectado em sementes em reação LAMP conduzida a 65° C por 60 minutos e, para *S. sclerotiorum*, a 63°C por 45 minutos. Assim, é possível concluir que LAMP pode ser usada para detecção rápida e acurada de *R. solani* e *S. sclerotiorum* em sementes de feijão infectadas. No Capítulo 2, avaliou-se o efeito da DAS por três semanas com farelo de soja, farelo de arroz e casca de soja, na dose de 9 ton/ha, na viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum* e de *Stromatinia cepivora* (para comparação) em condições de campo. A DAS com farelo de soja reduziu em 40% a viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum* e a de escleródios de *S. cepivora* em 52,5%. A DAS por três semanas reduz a viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum*, principalmente usando farelo de arroz como fonte de carbono.

Palavras-chave: Controle de doenças de plantas. Desinfestação biológica do solo. Diagnose molecular. Mofo branco. *Phaseolus vulgaris*.

ABSTRACT

LEITE, Laudiane Érica, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2019. **Detection of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum* in common bean seeds by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and reduction of viability of *S. sclerotiorum* sclerotia by anaerobic soil disinfestation.** Advisor: Everaldo Antônio Lopes. Co-advisor: Geraldo Humberto Silva.

Sclerotinia sclerotiorum and *Rhizoctonia solani* cause significant damage to common bean. These fungi survive in the soil as sclerotia and are dispersed over long distances by seed. The accurate detection of seed pathogens and the reduction of the viability of fungal survival structures in the field can contribute to decrease agricultural losses. The main hypothesis of this work was that the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique could be used for detection of *S. sclerotiorum* and *R. solani* in common bean seeds and that the anaerobic soil disinfestation (DAS) method would reduce the viability of *S. sclerotiorum* sclerotia in the field. In Chapter 1, we aimed to validate the detection protocol of *R. solani* and *S. sclerotiorum* in common bean seeds by LAMP. Lots of healthy seeds free, and seeds naturally and artificially infected with these fungi were used to validate the technique. *Rhizoctonia solani* was detected in seeds in LAMP reaction at 65°C for 60 minutes and, for *S. sclerotiorum*, at 63°C for 45 minutes. Thus, it can be concluded that LAMP can be used for rapid and accurate detection of *R. solani* and *S. sclerotiorum* in infected common bean seeds. In Chapter 2, the effect of DAS for three weeks with soybean bran, rice bran and soybean hulls, at 9 ton / ha, was evaluated on the viability of *S. sclerotiorum* and *Stromatinia cepivora* sclerotia (for comparison) under field conditions. DAS using rice bran reduced by 40% the viability of *S. sclerotiorum* sclerotia and of *S. cepivora* by 52.5%. DAS for three weeks reduces the viability of *S. sclerotiorum* sclerotia, mainly using rice bran as a carbon source.

Keywords: Control of plant diseases. Anaerobic soil disinfestation. Molecular diagnostics. White mold. *Phaseolus vulgaris*.

SUMÁRIO

Introdução Geral.....	09
Referências Bibliográficas.....	11
CAPÍTULO I - Validação da detecção de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Rhizoctonia solani</i> em sementes de feijão por meio da técnica de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP).....	13
Resumo.....	13
Abstract.....	14
Introdução.....	15
Material e Métodos	17
Resultados e Discussão.....	21
Conclusões.....	27
Referências Bibliográficas	28
CAPÍTULO II – Desinfestação anaeróbica do solo reduz a viabilidade de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	31
Resumo.....	31
Abstract.....	32
Introdução.....	33
Material e Métodos.....	35
Resultados e Discussão.....	37
Conclusões.....	42
Referências Bibliográficas.....	43

INTRODUÇÃO GERAL

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) é uma leguminosa de importância econômica, social e nutricional no Brasil. O país é o maior produtor mundial da cultura, com produção de 3,26 milhões de toneladas e área cultivada de 3,1 milhões de hectares (IBGE, 2018). O feijoeiro é cultivado em três safras no Brasil: feijão das águas (plantio em novembro / dezembro), da seca (plantio em janeiro / fevereiro) e cultivo de inverno (plantio em abril, maio, junho), favorecendo a disseminação e sobrevivência de inóculos de patógenos no solo.

O plantio de sementes sadias é fundamental para evitar a introdução de patógenos no campo. Feijocultores brasileiros comumente usam sementes produzidas em suas propriedades ou compram seus materiais de plantio de outros agricultores, sem a devida inspeção da sanidade das sementes. Tal fato favorece a dispersão de patógenos e, conseqüentemente, reduz o rendimento da cultura e eleva os custos de produção (Botelho et al., 2013).

Métodos baseados em observação visual de sintomas em sementes ou plântulas ou de sinais de patógenos após incubação são os mais comumente usados para detecção de patógenos em sementes (Brasil, 2009a). Técnicas de imunodiagnose e métodos moleculares também podem ser usados na diagnose de fitopatógenos em sementes de feijão (Guimarães et al., 2017). Considerando que os fungos são os patógenos mais comumente transportados em sementes, o teste de blotter é o mais usado em rotinas laboratoriais (Brasil, 2009b). O teste é moroso, demanda conhecimento específico em micologia e os resultados podem ser controversos ou mascarados pelo crescimento de outros microrganismos. Por sua vez, a técnica de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) pode ser uma opção para detecção de fungos em sementes. O método amplifica ácidos nucleicos com alta especificidade, sensibilidade e rapidez em condições isotérmicas (Notomi et al., 2000) e tem sido usado para diagnose de inúmeros fitopatógenos (Tomlinson & Boonham, 2008). *Sclerotinia sclerotiorum* e *R. solani* são importantes patógenos da cultura do feijão transportados por sementes. Em ambos os casos, protocolos de identificação dessas espécies baseados em LAMP já foram desenvolvidos, usando como micélio puro como fonte de DNA (Duan et al., 2014; Lu et al., 2015). Uma das hipóteses deste trabalho é que a detecção de *R. solani* e *S. sclerotiorum* em

sementes por meio de LAMP é possível. No entanto, a técnica ainda não foi validada para detecção desses fungos em sementes de feijão.

Outra abordagem estudada neste trabalho é a possibilidade da desinfestação anaeróbica do solo (DAS) ser usada para reduzir a viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum*. A técnica é uma alternativa ecológica à fumigação química do solo e foi desenvolvida de forma independente no Japão (Shinmura, 2000; Shinmura, 2004) e Holanda (Blok et al., 2000). Materiais orgânicos facilmente decomponíveis (relação C:N de 8-20:1) são incorporados ao solo, seguido de irrigação até saturação e cobertura do solo com plástico impermeável por 3 a 10 semanas (Roskopf et al., 2014; Shennan et al., 2014). Com abundância de carbono orgânico no solo e limitação de oxigênio disponível, ocorre aumento drástico do crescimento e da atividade de microrganismos anaeróbicos facultativos (Roskopf et al., 2014; Shennan et al., 2014; Shrestha et al., 2016). Os mecanismos de ação da DAS incluem a combinação de produtos tóxicos da decomposição anaeróbica, antagonismo exercido por organismos anaeróbicos e falta de oxigênio (Runia et al., 2014; Shennan et al., 2014; Strauss & Kluepfel, 2015).

Uma metanálise publicada em 2016 revelou que o controle de bactérias, oomicetos e patógenos fúngicos com uso da DAS varia entre 59 e 64%, enquanto o efeito da técnica sobre fitonematoides é 15 a 56% (Shrestha et al., 2016). No entanto, o número de pesquisas disponíveis envolvendo *S. sclerotiorum* é relativamente baixo, principalmente se comparado com outros fungos, tais como espécies de *Fusarium*, *Verticillium* e *Rhizoctonia* é abundante na literatura (Strauss & Kluepfel, 2015; Shrestha et al., 2016). Assim, torna-se necessário avaliar se a DAS pode ser usada no manejo de *S. sclerotiorum*.

Este trabalho foi dividido em dois capítulos. No primeiro, buscou-se validar o uso do LAMP para detecção de *R. solani* e *S. sclerotiorum* em sementes de feijão. No segundo, avaliamos o efeito da DAS na redução da viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLOK, W.J.; LAMERS, J.G.; TERMORSHUIZEN, A.J.; BOLLEN, G.J. 2000. Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. **Phytopathology**, 90: 253–259.
- BOTELHO, L.S.; ZANCAN, W.L.A.; MACHADO, J.C.; BARROCAS, E.N. 2013. Performance of common bean seeds infected by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Seed Science**, 35: 153-160.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009a. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ ACS Brasília, DF. 395 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/regras-para-analise-de-sementes.pdf/view>. Acesso em: 17/11/2019.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009b. **Manual de análise sanitária de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 200 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/sementes-e-mudas/publicacoes-sementes-e-mudas/manual-de-analise-sanitaria-de-sementes/view>. Acesso em: 17/11/2019.
- DUAN, Y; GE, C.; ZHANG, X.; WANG, J.; ZHOU, M. 2014. A rapid detection method for the plant pathogen *Sclerotia sclerotiorum* based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **Australasian Plant Pathology**, 43: 61-66.
- GUIMARÃES, M.R.F.; SIQUEIRA, C.S.; MACHADO, J.C.; FRANÇA, S.K.S.; GUIMARÃES, G.C. 2017. Evaluation of inoculum potential of pathogens in seeds: relation to physiological quality and DNA quantification by qPCR. **Journal of Seed Science**, 39: 224-233.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2018). **IBGE prevê safra de grãos 9,2% menor em 2018**. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2013-agencia-de-noticias/releases/18665-ibge-preve-safra-de-graos-9-2-menor-em-2018.html>. Acesso em: 12 de março de 2018.
- LU, C.; SONG, B.; ZHANG, H.; WANG, Y.; ZHENG, X. 2015. Rapid Diagnosis of soybean seedling blight caused by *Rhizoctonia solani* and soybean charcoal rot

- caused by *Macrophomina phaseolina* using LAMP assays. **Phytopathology**, 105: 1612–1617.
- NOTOMI, T.; OKAYAMA, H.; MASUBUCHI, H.; YONEKAWA, T.; WATANABE, K.; AMINO, N.; HASE, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, 28: e63.
- ROSSKOPF, E.N.; BURELLE, N.; HONG, J.; BUTLER, D.M.; NOLING, J.W.; HE, Z.; BOOKER, B.; SANCES, S. 2014. Comparison of anaerobic soil disinfestation and drip-applied organic acids for raised-bed specialty crop production in Florida. **Acta Horticulturae**, 1044: 221–228.
- RUNIA, W.T.; THODEN, T.C.; MOLENDIJK, L.P.G.; van den BERG, W.; TERMORSHUIZEN, A.J.; STREMINSKA, M.A.; van der WURFF, A.W.G.; FEIL, H.; MEINTS, H. 2014. Unravelling the mechanism of pathogen inactivation during anaerobic soil disinfestation. **Acta Horticulturae**, 1044: 177–193.
- SHENNAN, C.; MURAMOTO, J.; LAMERS, J.; MAZZOLA, M.; ROSSKOPF, E.N.; KOKALIS-BURELLE, N.; MOMMA, N.; BUTLER, D.M.; KOBARA, Y. 2014. Anaerobic soil disinfestation for soil borne disease control in strawberry and vegetable systems: current knowledge and future directions. **Acta Horticulturae**, 1044: 165–175.
- SHINMURA, A. 2000. Causal agent and control of root rot of welsh onion. **PSJ Soilborne Disease Workshop Report**, 20: 133-143.
- SHINMURA, A. 2004. Principle and effect of soil sterilization method by reducing redox potential of soil. **PSJ Soilborne Disease Workshop Report**, 22: 2–12.
- SHRESTHA, U.; AUGÉ, R.M.; BUTLER, D.M. 2016. A meta-analysis of the impact of anaerobic soil disinfestation on pest suppression and yield of horticultural crops. **Frontiers in Plant Science**, 7: 1254, Article 1254.
- STRAUSS, S.L.; KLUEPFEL, D.A. 2015. Anaerobic soil disinfestation: A chemical-independent approach to pre-plant control of plant pathogens. **Journal of Integrative Agriculture**, 14: 2309-2318.
- TOMLINSON, J.; BOONHAM, N. 2008. Potential of LAMP for detection of plant pathogens. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, 3: 1-7.

CAPÍTULO I

Validação da detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani* em sementes de feijão por meio da técnica de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP)

RESUMO

A análise da qualidade sanitária de sementes é uma ferramenta importante para evitar a dispersão de fitopatógenos e minimizar perdas econômicas. A técnica de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) pode ser uma opção para detecção de fungos em sementes de feijão, incluindo *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*. No entanto, a técnica ainda não foi validada para detecção desses fungos em sementes de feijão comum. Assim, objetivamos com este trabalho validar o protocolo de detecção de *R. solani* e *S. sclerotiorum* em sementes de feijoeiro comum por LAMP. Lotes de sementes livres desses patógenos e de sementes naturalmente infectadas foram usadas para validação da técnica. Teste de blotter e observação de sintomas em plântulas foram usados para confirmar a presença dos patógenos. Sementes isentas foram inoculadas artificialmente com *R. solani* e *S. sclerotiorum*. DNA foi extraído de sementes naturalmente e artificialmente e usado no LAMP, seguindo protocolos de Duan et al. (2014) e Lu et al. (2015). *Rhizoctonia solani* foi detectado em sementes em reação LAMP conduzida a 65° C por 60 minutos e, para *S. sclerotiorum*, a 63°C por 45 minutos. Com uso do corante azul hidroxinaftol foi possível detectar a amplificação com a mudança de cor da solução nos tubos de reação. Assim, é possível concluir que LAMP pode ser usada para detecção rápida e acurada de *R. solani* e *S. sclerotiorum* em sementes de feijão comum infectadas.

Palavras-chaves: Diagnose molecular, mofo branco, *Phaseolus vulgaris*, podridão radicular, sanidade de sementes.

Validation of detection of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani* in common bean seeds by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique

ABSTRACT

Analysis of seed health quality is an important tool to prevent the spread of plant pathogens and minimize economic losses. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) may be an option for detecting fungi in common bean seeds, including *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum*. However, the technique has not yet been validated to detect these fungi in common bean seeds. Thus, we aimed to validate the detection protocol of *R. solani* and *S. sclerotiorum* in common bean seeds by LAMP. Batches of healthy seeds and naturally infected seeds were used to validate the technique. Blotter test and observation of seedling symptoms were used to confirm the presence of pathogens. Healthy seeds were artificially inoculated with *R. solani* and *S. sclerotiorum*. DNA was extracted from seeds naturally and artificially and used in LAMP, following protocols by Duan et al. (2014) and Lu et al. (2015). *Rhizoctonia solani* was detected in seeds in LAMP reaction conducted at 65°C for 60 minutes and, for *S. sclerotiorum*, at 63°C for 45 minutes. Using the blue hydroxynaphthol dye it was possible to detect amplification by changing the color of the solution in the reaction tubes. Thus, it can be concluded that LAMP can be used for rapid and accurate detection of *R. solani* and *S. sclerotiorum* in infected common bean seeds.

Key words: Molecular diagnosis, white mold, *Phaseolus vulgaris*, root rot, seed health.

1. INTRODUÇÃO

As condições ambientais do Brasil são favoráveis a ocorrência de doenças em todas as regiões produtoras de feijão (Sartorato & Rava, 2003). A dispersão de patógenos a curtas distâncias pode ocorrer por vento e água. No entanto, a dispersão a longas distâncias ocorre principalmente por meio de sementes infectadas. Os patógenos transportados pela semente constituem inóculo primário que, em condições favoráveis, podem originar graves epidemias e causar drásticas reduções no estande ou no rendimento de grãos (Botelho et al., 2013). Dentre as principais doenças que ocorrem na cultura do feijoeiro no Brasil, a maioria pode ser disseminada por meio de sementes (Francisco & Usberti, 2008), incluindo antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), mancha angular (*Pseudocercospora griseola*), podridão radicular de *Rhizoctonia* (*Rhizoctonia solani*), mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), murcha de *Sclerotium* (*Athelia rolfsii*, sin = *Sclerotium rolfsii*), murcha de *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* sp. *phaseoli*), podridão radicular seca (*Fusarium solani*), mancha de *Alternaria* (*Alternaria* spp.), podridão radicular (*Macrophomina phaseolina*), crestamento bacteriano (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*), murcha de *Curtobacterium* (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) e o mosaico comum (*Bean common mosaic virus* – BCMV).

O plantio de sementes saudáveis é fundamental para evitar a introdução de patógenos no campo. No Brasil, é prática comum dos agricultores produzirem a própria semente ou comprarem de produtores vizinhos, sem a devida inspeção da sanidade das sementes. Tal fato favorece a dispersão de patógenos e, conseqüentemente, reduz o rendimento da cultura e eleva os custos de produção (Botelho et al., 2013). Poucas empresas disponibilizam sementes certificadas para os produtores e, devido ao fato dessas sementes serem mais caras do que as produzidas pelos próprios agricultores, o seu uso não é comum, ao contrário de outras culturas, a exemplo do milho e da soja. De forma geral, os produtores de feijão buscam informações sobre germinação e vigor de suas sementes não certificadas, mas negligenciam a sanidade dos lotes. A análise da qualidade sanitária de sementes é uma ferramenta importante para evitar a dispersão de patógenos e minimizar perdas econômicas (Guimarães et al., 2017).

A identificação de patógenos em sementes pode ser feita por exame de sementes secas, métodos com ou sem incubação das sementes e com

observação dos sintomas ou sinais do patógeno, técnicas de imunodiagnose e métodos moleculares (Guimarães et al., 2017). Os fungos são os patógenos mais comumente encontrados em sementes. O método de papel-filtro (*blotter test*) é o mais usado para detecção de fungos em sementes (Brasil, 2009a). A técnica depende da incubação de sementes em ambiente úmido por uma a duas semanas, seguida da observação das estruturas dos patógenos na superfície das sementes. Apesar de sua simplicidade e ser usado para detecção de vários gêneros de fungos fitopatogênicos, os resultados podem ser controversos ou mascarados pelo crescimento de outros microrganismos. Além disso, a identificação baseada na morfologia demanda tempo superior a uma semana, requer exame microscópico e conhecimento específico de micologia (Patel et al., 2015). Para fins práticos, testes que detectam fungos fitopatogênicos em sementes devem ser acurados, rápidos, simples de executar e com preço acessível (Lu et al., 2015).

A técnica de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) pode ser uma opção para detecção de fungos em sementes. O método amplifica ácidos nucléicos com alta especificidade, sensibilidade e rapidez em condições isotérmicas (Notomi et al., 2000) e tem sido usado para diagnose de inúmeros fitopatógenos (Tomlinson & Boonham, 2008). *Sclerotinia sclerotiorum* e *R. solani* são importantes patógenos da cultura do feijão transportados por sementes. Em ambos os casos, protocolos de identificação dessas espécies baseados em LAMP já foram desenvolvidos, usando como micélio puro como fonte de DNA (Duan et al., 2014; Lu et al., 2015). A hipótese deste trabalho é que a detecção de *R. solani* e *S. sclerotiorum* em sementes por meio de LAMP é possível e vantajosa, uma vez que a técnica é rápida, acurada, não necessita de observação de bandas em gel e depende de equipamentos baratos para manter as condições isotérmicas da reação, como banho maria ou bloco de aquecimento. No entanto, a técnica ainda não foi validada para detecção desses fungos em sementes de feijão. Assim, objetivamos com este trabalho validar o protocolo de detecção de *R. solani* e *S. sclerotiorum* em sementes de feijoeiro comum.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Identificação de fungos em sementes

Três lotes de sementes de feijoeiro comum (*P. vulgaris*) cultivar BRS Pérola foram usados neste trabalho. O lote I foi composto por sementes certificadas de primeira geração (C1) obtidas junto à EMBRAPA Arroz e Feijão. As sementes do lote II foram produzidas na Fazenda Águas Claras (Tiros, MG) na safra 2017/2018 (lote II), enquanto as sementes do lote III foram obtidas de sementeira comercial do município de Patos de Minas.

A presença de fungos nas sementes foi avaliada por meio do teste padrão de sanidade – *blotter test* (Brasil, 2009b). Para isso, caixas de acrílico do tipo gerbox foram esterilizadas e receberam três folhas de papel germitest. Os papéis foram umedecidos com água estéril e 2,4-D + glifosato. Em seguida, 400 sementes foram dispostas nas caixas, com o máximo de 20 unidades por gerbox. Metade do lote de sementes foi desinfestado superficialmente (hipoclorito de sódio 1% por 5 min, água destilada autoclavada por 1 min) e a outra metade não foi desinfestada. As sementes foram então mantidas em BOD a 25° C por 7 dias e 15° C por 15 dias para *S. sclerotiorum*. A incidência de fungos nas sementes foi determinada após observação das estruturas dos patógenos com uso de microscópio de luz.

2.2. Isolamento de fungos

Sementes do lote II foram cultivadas em campo e plantas com sintomas de doenças induzidas por *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* foram coletadas para isolamento dos fungos. Amostras de raízes e caules foram colocados em saco plástico com papel toalha umedecido por um dia, para estimular o crescimento dos patógenos. Em seguida, realizou-se isolamento indireto e direto dos patógenos (Alfenas & Mafia, 2016) em meio batata dextrose ágar (BDA), enriquecido com ácido láctico (1 µL / 1 mL de meio), e incubação a 25° C por 7 dias. Os fungos foram identificados com uso de microscópio de luz e discos de micélio de culturas puras foram transferidos para tubos eppendorf contendo água destilada e mantidos na geladeira a 10 °C até uso (Alfenas & Mafia, 2016).

2.3. Inoculação de sementes

Duzentas sementes do lote I, isentas de *R. solani* e *S. sclerotiorum*, foram usadas para inoculação artificial desses fungos. As sementes foram desinfestadas superficialmente com álcool 70% por 1 minuto, seguido de imersão em hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos, lavagem em água destilada autoclavada e secagem em papel filtro. As sementes foram colocadas em dez caixas gerbox estéril, dispostas 20 em cada, contendo três folhas de papel germitest embebido com micélios de *S. sclerotiorum* ou *R. solani* em meio batata dextrose (BD) de 7 a 10 dias de idade. As caixas foram vedadas com papel filme, envolto em papel alumínio e mantidas em BOD a 25°C por sete dias.

Testes de avaliação fisiológica e de qualidade sanitária de sementes inoculadas (blotter test) foram realizados de acordo com a Regra de Análise de Sementes – RAS (Brasil, 2009a). Vinte sementes foram semeadas em bandejas de polietileno contendo substrato autoclavado solo:areia (1:1, v:v). Após 20 dias, avaliou-se o aparecimento de plantas doentes, quantificando-se a incidência de podridões de *R. solani* e *S. sclerotiorum*.

2.4. Extração de DNA fúngico

Micélios de *R. solani* e *S. sclerotiorum* foram retirados de culturas puras em BDA e transferido para eppendorfs de 2 mL com auxílio de pinça estéril. A extração do DNA seguiu o protocolo do kitHiPurA® para extração de DNA do solo (<http://himedialabs.com/TD/MB542.pdf>), com algumas alterações. Na etapa inicial, 650 µL de tampão de lise foram adicionados ao tubo, seguido da etapa de lavagem, que foi realizada por mais duas vezes. O DNA foi armazenado em -20 °C até uso. A visualização do DNA extraído se deu em gel de agarose (1%) corado com SYBR Safe (1X; Invitrogen) sob luz UV. As concentrações de DNA e de proteínas foram determinadas pela razão de absorbância A_{260}/A_{280} por espectrofotometria UV/Visível. A concentração de DNA foi superior a 60 ng / µL.

2.5. Extração de DNA de sementes

O DNA de sementes do lote I, não inoculadas e inoculadas artificialmente com *R. solani* e *S. sclerotiorum*, e do lote II, naturalmente infectadas com esses patógenos, foi extraído de acordo com o protocolo de Doyle & Doyle (1987) para uso na técnica de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP). As sementes foram inicialmente maceradas em nitrogênio líquido. A solução de CTAB (5%) foi previamente aquecida em banho maria a 37 °C para o preparo do

tampão de extração (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 0,02 M, Tris HCL ph = 8 0,1 M, PVP sólido 0,3 g, β - mercaptoetanol 0,4% e 2,7 mL de H₂O ultrapura). O tampão foi adicionado ao material logo após a maceração, para evitar oxidação. As etapas de extração, purificação (RNA'se), precipitação (Isopropanol), lavagem (etanol 70%) e de ressuspensão do DNA (H₂O estéril) foram seguidas assim como descrito por Doyle & Doyle (1987). O DNA foi armazenado em -20 °C até uso. A concentração de DNA também foi superior a 60 ng / μ L.

2.6. Detecção de *R. solani* e *S. sclerotiorum* em sementes de feijão por meio de LAMP

Os protocolos para identificação dos fungos por LAMP foram realizados conforme descritos por Duan et al. (2014) e Lu et al. (2015). Os primers F3, B3, FIP e BIP usados neste trabalho (Tabela 1) foram desenhados usando como alvos o gene *Ssos5*, para detecção de *S. sclerotiorum*, e a sequência ITS (HG934415.1) para *R. solani*. As reações para detecção de ambos os fungos foram realizadas em volume total de 25 μ L e os componentes e suas concentrações foram usados conforme protocolos descritos por Duan et al. (2014) e Lu et al. (2015), com pequenas alterações listadas na Tabela 2. A reação de *S. sclerotiorum* ocorreu a 63 °C por 45 minutos, enquanto para *R. solani* ocorreu a 65 °C por 60 minutos. Para inativar a ação da DNA polimerase, as reações foram submetidas a 80°C por 10 minutos. Para o controle negativo, usou-se água livre de nuclease no lugar de DNA.

A visualização dos resultados se deu pela utilização do íon metálico azul de hidroxinaftol (HNB) no início da reação. Quando ocorre amplificação, a coloração da solução muda de violeta para azul e permanece violeta na ausência de amplificação. Os produtos da reação também foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (3%) a 45 V por 1 hora. O gel foi corado com SYBR Safe (1X) e a visualização das bandas ocorreu em transiluminador sob luz UV. No caso de amplificação, bandas no formato de escada, típicas de LAMP (Notomi et al., 2000) foram visualizadas.

Tabela 1 – Primers usados para identificação de *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss) e *Rhizoctonia solani* (Rs) por meio da técnica de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP).

Primer	Sequência (5'-3')
F3 Ss	GACTTCGCTACCAAAGATAGCC
B3 Ss	AGATCTAGACCCCGGTATCG
FIP Ss	GGCACGGAGAGATGGTAGAGAAGGCCAATCGAATGAAGCTCCCAC
BIP Ss	TCGACCATGACAGCATCTTCTACCCACCAGGTCTTGGTCGTCTG
F3 Rs	CGAAATGCGATAAGTAATGTGAA
B3 Rs	AGAGGAGCAGGTGTGAAG
FIP Rs	GCTCCAAGGAATACCAAGGAGCCAGAATTCAGTGAATCATCATCGAATC
BIP Rs	TGCCTGTTTGAGTATCATGAATTCTAAAAGACCTCCAATACCAAAG

Tabela 2 - Reagentes e concentrações de reação de 25 µL para identificação de *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss) e *Rhizoctonia solani* (Rs) pela técnica de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP).

Reagente	Concentração – Ss	Concentração – Rs
Primer FiP	1,2 µM	0,8 µM
Primer BiP	1,2 µM	0,8 µM
Primer F3	0,2 µM	0,1 µM
Primer B3	0,2 µM	0,1 µM
Betaína	1,28 M	0,8 M
Tampão 10x	1 x	1 x
dNTP	1mM	1,4 mM
MgSO ₄	4 mM	6 mM
Bst DNA polimerase	8 U	8 U
HNB	150 µM	150 µM
DNA	2 µL	4 µL

Bst polimerase, Tampão 10X e MgSO₄ fornecidos pela New England Biolabs. Reação Ss = 63

°C por 45 min. Reação Rs = 65 °C por 60 min.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Identificação de fungos em sementes – Métodos convencionais

Sementes certificadas adquiridas na Embrapa Arroz e Feijão (Lote I) submetidas ao teste de blotter não estavam infectadas com *S. sclerotiorum*, *R. solani*, além de outros fungos fitopatogênicos relevantes para a cultura do feijão, incluindo *C. lindemuthianum*, causador da antracnose, e *P. griseola*, agente causal da mancha angular (Tabela 2). Apenas *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., fungos tipicamente de armazenamento, foram encontrados neste lote. Possivelmente, a presença desses organismos pode ter sido consequência do armazenamento das sementes em condições mais úmidas logo após a aquisição. Nos lotes de sementes não certificadas (lotes II e III), observou-se a presença de *S. sclerotiorum*, *R. solani*, *C. lindemuthianum* e *P. griseola*, além dos fungos de armazenamento *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. (Tabela 2).

O transporte de patógenos via material propagativo é preocupante, principalmente daqueles que formam estruturas de resistência e sobrevivem no solo por anos, a exemplo de *R. solani* e *S. sclerotiorum*, fungos formadores de escleródios. Esses fungos podem limitar o cultivo do feijoeiro em áreas infestadas. *Rhizoctonia solani* infecta centenas de hospedeiros, provoca lesões no sistema radicular de plântulas, levando ao tombamento e diminuição do estande. *Sclerotinia sclerotiorum* também possui ampla gama de hospedeiros, causando doença conhecida como mofo branco, em razão de formar micélio branco e cotonoso sobre as partes da planta onde coloniza e leva à podridão de plantas jovens ou adultas. Assim, os resultados obtidos neste trabalho reforçam a importância da aquisição de sementes com qualidade sanitária. Os agricultores devem buscar analisar os lotes de sementes que usarão em seus cultivos, devido ao risco de introduzirem patógenos agressivos em suas áreas de produção, podendo inviabilizar a área ou reduzir significativamente a produção de grãos. Sementes do lote II, por exemplo, quando cultivadas em campo deram origem a plantas doentes e que produziram aproximadamente 1350 kg/ha, inferior ao potencial produtivo da cultivar Pérola, que é de 3903 kg/ha (EMBRAPA, 2006).

Plântulas oriundas de sementes do lote II cultivadas em bandejas tiveram sintomas causados por *R. solani* e *C. lindemuthianum*, com incidência total de plantas de 48,7% de plantas doentes. Sementes do lote I, inoculadas

artificialmente com *R. solani* e *S. sclerotiorum*, deram origem também a plântulas com sintomas de *R. solani* e *C. lindemuthianum*, com incidência total de 80% de plantas doentes. Os sintomas observados são lesões deprimidas marrom avermelhadas na parte basal do hipocótilo para *R. solani* e manchas alongadas de cor avermelhada sobre as nervuras. Em razão da limitação do substrato para crescimento das plantas, sintomas de *S. sclerotiorum* não foram observados, uma vez que são mais comuns em plantas no estágio reprodutivo. Considerando que o solo não estava infestado com os patógenos, as sementes foram fonte de inóculo primário.

Tabela 3 – Incidência de fungos (%) em três lotes de sementes de feijão cultivar Pérola pelo método do papel filtro (*Blotter test*).

Patógeno	Lote I		Lote II		Lote III	
	SD	SND	SD	SND	SD	SND
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	-	-	12	-	17	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	-	-	32	51	27	39
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	-	-	63	89	62	78
<i>Pseudocercospora griseola</i>	-	-	76	82	47	72
<i>Aspergillus</i> spp.	33	67	73	84	37	64
<i>Penicillium</i> spp.	48	87	55	92	52	76

Lote I: Sementes certificadas de primeira geração C1 – Embrapa Arroz e Feijão. Lote II: Sementes produzidas na Fazenda Águas Claras (Tiros, MG) na safra 2017/2018 (lote II). Lote III: Sementes do lote III obtidas de sementeira comercial. SD = Sementes desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio. SND = Sementes não desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio.

A germinação de sementes foi de 97%, 92% e 95% para os lotes I, II e III, respectivamente. A viabilidade e vigor pelo teste de tetrazólio foi de 84% e 62% no lote I, 74% e 52% no lote II, 80% e 62% no lote III quando avaliadas danos provenientes da colheita (mecânico), por umidade, percevejos e duras.

3.2. Detecção de *R. solani* e *S. sclerotiorum* em sementes de feijão por meio de LAMP

Houve amplificação de DNA de micélio de *S. sclerotiorum* e *R. solani*, confirmado pela mudança de cor de violeta para azul com uso de HNB e pela presença de bandas em padrão de escada (Figura 1). A alta especificidade do LAMP permite detecção de picogramas ou até mesmo fentogramas de DNA/RNA alvo (Lee & Vu, 2017). Logo, as concentrações de DNA micelial utilizado nas reações LAMP foram suficientes para observação de resultados positivos, indicando que os protocolos descritos por Duan et al. (2014) e Lu et al. (2015) podem ser usados para identificar *R. solani* e *S. sclerotiorum*.

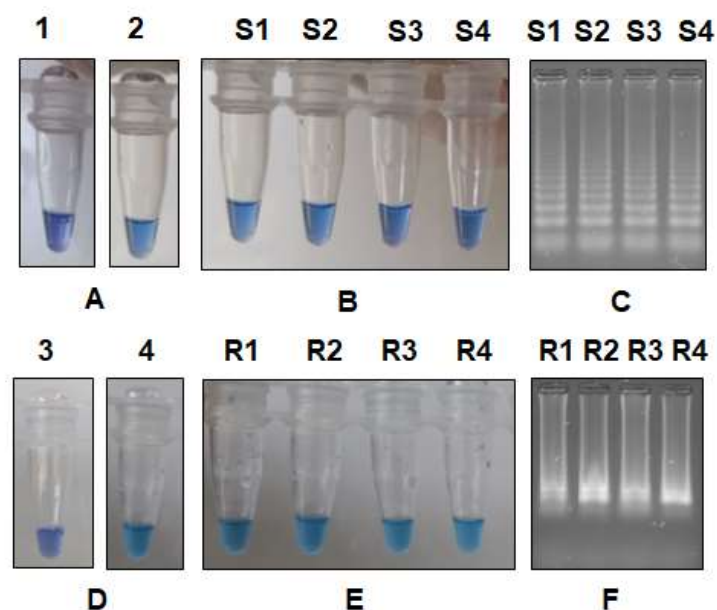


Figura 1 – Amplificação de DNA de *Sclerotinia sclerotiorum* (A, B, C) e de *Rhizoctonia solani* (D, E, F) por LAMP. Com uso de HNB, a coloração inicial da reação muda de violeta (1, 3) para azul (2, 4) em função da amplificação do DNA. Reação final com coloração azul demonstra a presença de *S. sclerotiorum* (B) e *R. solani* (E). Bandas em padrão de escada, típicas de amplificação por LAMP nas amostras S1 a S4 (C) e R1 a R4 (F).

Quando as reações foram realizadas com DNA extraído de sementes, foi possível detectar a presença de *S. sclerotiorum* e *R. solani* em sementes inoculadas (Figura 2), embora a presença de bandas em padrão de escada, típicas de LAMP, não tenha sido observada em algumas amostras de *S.*

sclerotiorum (Figura 2A). No entanto, a coloração inicial da solução antes da reação para detecção de ambos os fungos foi azul claro, típico de amostras contendo HNB e que sofreram amplificação (Figura 2). Mesmo em sementes não inoculadas, a coloração da reação permaneceu azul desde o início, embora nenhuma banda tenha sido observada em gel (dados não apresentados). Desta forma, não foi possível detectar *S. sclerotiorum* e *R. solani* em sementes com base na coloração da reação, apenas por eletroforese em gel de agarose.

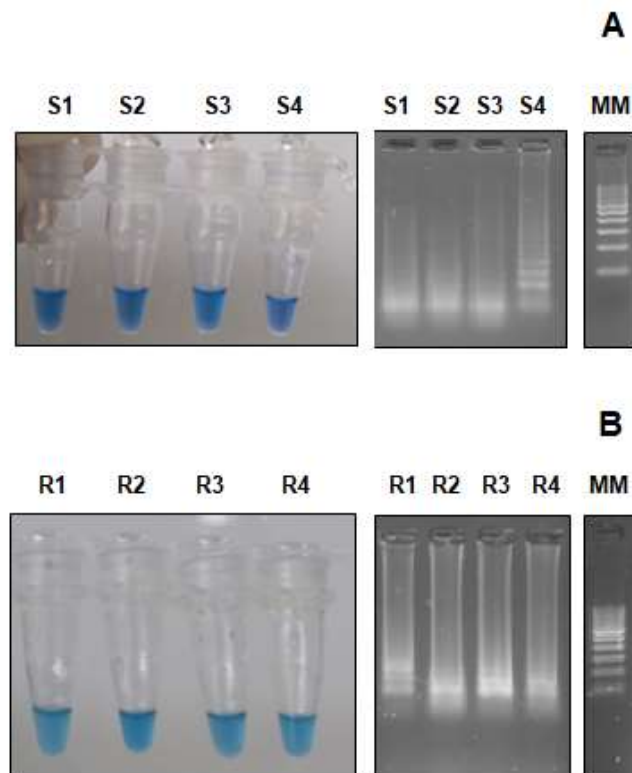


Figura 2 – Amplificação de DNA de *Sclerotinia sclerotiorum* (A) e de *Rhizoctonia solani* (B) em amostras de sementes de feijão por LAMP. Com uso de HNB, a solução adquiriu coloração azul antes do processo de amplificação isotérmica para sementes inoculadas com *S. sclerotiorum* (S1 a S4) e *R. solani* (R1 a R4). Em gel de agarose, as amostras S4, R1, R2, R3 e R4 formaram bandas em padrão de escada, típicas de LAMP. MM = marcador de peso molecular de 100 pb.

A amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) é uma técnica acurada, simples e robusta para amplificação de DNA, mesmo quando a concentração do alvo é baixa e as amostras não são tão puras (Tomita et al.,

2008; Lu et al., 2015). De forma geral, são produzidas até 10^9 cópias do DNA alvo em menos de uma hora (Notomi et al., 2000; Tomita et al., 2008). Por demandar condições isotérmicas, a reação pode ser feita com uso de equipamentos de baixo custo, como banho maria e blocos de aquecimento (Notomi et al., 2000). Em condições ideais, a visualização dos resultados deve ser feita a olho nu, com uso de indicadores colorimétricos ou intercalantes de DNA e não demandar a observação de bandas em gel de agarose (Goto et al., 2009). Os principais indicadores de amplificação usados em LAMP são Syber Green I, calceína e azul de hidroxinaftol (HNB) (Tomita et al., 2008; Goto et al., 2009). Dentre esses reagentes, o mais vantajoso é o HNB, por ser barato, não interferir na reação e não demandar a abertura de tubos após o processo de amplificação, o que pode causar contaminação de amostras e gerar falsos positivos (Goto et al., 2009). No nosso trabalho, o uso de HNB foi indicador eficiente quando DNA micelial foi usado, mas o mesmo não aconteceu quando DNA foi extraído de sementes.

O HNB é um indicador de metais, a exemplo do magnésio. Quando ocorre a amplificação de DNA, pirofosfato é formado e se liga a íons de Mg^{2+} , resultando em precipitado branco e reduzindo a disponibilidade de magnésio livre na solução (Notomi et al., 2000). Assim, a solução contendo HNB terá coloração violeta na presença de altas concentrações de magnésio livre, mas se tornará azul quando a concentração do metal for reduzida. Essa redução será promovida em caso de amplificação do DNA (Goto et al., 2009). No entanto, para que essa alteração de cor aconteça e indique que houve amplificação, ajustes nos componentes da reação devem ser feitos. As concentrações de dNTP's, primers, $MgSO_4$ e HNB podem influenciar na coloração da solução (Goto et al., 2009). Assim, em estudos futuros, testes devem ser realizados para ajustar as condições de reação para que seja possível detectar a presença de *S. sclerotiorum* e *R. solani* em sementes com uso de HNB. É importante ressaltar que Duan et al. (2014) usaram Syber Green I como indicador de amplificação, que deve ser adicionado aos tubos ao final da reação, com posterior observação sob luz ultravioleta (Duan et al., 2014). Esse procedimento pode causar contaminação de amostras e resultar em falsos positivos (Tomita et al., 2008), além do SYBR Green I ser mais caro do que o HNB. Em nosso trabalho foi possível demonstrar que o HNB pode ser usado para detectar *R. solani*, mesmo que tal fato tenha sido observado aqui apenas com uso de DNA micelial. No

entanto, com os devidos ajustes nos componentes da reação é possível detectar o patógeno também em sementes usando HNB.

A sensibilidade de detecção do LAMP pode ser de 10 a 100 vezes maior do o PCR convencional (Ghosh et al., 2017; Lee & Vu, 2017). Essa sensibilidade pode ser vantajosa quando é necessário detectar patógenos em lotes de sementes infectadas, mesmo na presença de contaminantes. O fungo *Macrophomina phaseolina*, por exemplo, pode ser detectado em sementes de feijão comum por meio de LAMP, com reação ocorrendo a 65 °C por 45 minutos, usando HNB como indicador de amplificação e com limite de detecção de uma semente infectada por lote de 400 sementes (Rocha et al., 2017). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* é outro exemplo de fungo fitopatogênico que pode ser detectado em sementes infectadas com uso de LAMP (Ortega, et al., 2018).

A detecção de *S. sclerotiorum* e *R. solani* em sementes de feijão comum com uso de LAMP demonstrou-se possível e demanda apenas ajustes para otimizar a visualização dos resultados a olho nu usando HNB como indicador. Estudos futuros devem buscar fazer tais ajustes, além de considerar métodos mais simples de extração de DNA de sementes e o uso de kits liofilizados para reação (Francois et al., 2011; Chander et al., 2014; Ortega et al., 2018). Caso tais avanços ocorram, será possível a detecção de *S. sclerotiorum* e *R. solani* em condições de campo ou em laboratórios com equipamentos simples, necessários apenas para garantir as condições isotérmicas demandadas pela técnica. Conseqüentemente, a detecção acurada, simples e rápida de patógenos em sementes pode ajudar os produtores a evitar a introdução e dispersão de fitopatógenos em sementes e reduzir perdas de produção agrícola.

4. CONCLUSÕES

Patógenos importantes da cultura do feijoeiro são encontrados em sementes não certificadas produzidas e comercializadas por produtores do Alto Paranaíba, incluindo *S. sclerotiorum*, *R. solani*, *C. lindemuthianum* e *P. griseola*. A presença de patógenos nas sementes comprova a necessidade de normas na produção e comercialização de sementes, com exigências de testes confirmando a qualidade sanitária, física e genética do material propagativo. A identificação de fungos nas sementes antes do plantio por meio de testes rápidos e seguros são primordiais para evitar a introdução e, ou dispersão de patógenos.

A técnica de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) permite detectar *S. sclerotiorum* e *R. solani* em sementes de feijão comum. Para *S. sclerotiorum*, a reação deve ocorrer a 63 °C por 45 minutos e a 65 °C por 60 minutos para *R. solani*. Contudo, necessita-se otimizar os protocolos para a visualização dos produtos com uso de azul de hidroxinaftol como indicador colorimétrico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. 2016. **Métodos em Fitopatologia**. Editora UFV: Viçosa, 516p.
- BOTELHO, L.S.; ZANCAN, W.L.A.; MACHADO, J.C.; BARROCAS, E.N. 2013. Performance of common bean seeds infected by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Seed Science**, 35: 153-160.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009a. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ ACS Brasília, DF. 395 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/regras-para-analise-de-sementes.pdf/view>. Acesso em: 17/11/2019.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009b. **Manual de análise sanitária de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 200 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/sementes-e-mudas/publicacoes-sementes-e-mudas/manual-de-analise-sanitaria-de-sementes/view>. Acesso em: 17/11/2019.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, 19:11–15.
- DUAN, Y; GE, C.; ZHANG, X.; WANG, J.; ZHOU, M. 2014. A rapid detection method for the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **Australasian Plant Pathology**, 43: 61-66.
- EMBRAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2006. **Cultivares de feijão da Embrapa**. Brasília. Disponível em: <https://www.embrapa.br/cultivar/feijao>. Acesso em: 22/11/2019.
- FRANCISCO, F.G.; USBERTI, R. 2008. Seed health of common bean stored at constant moisture and temperature. **Scientia Agricola**, 65: 613-619.
- FRANCOIS, P.; TANGOMO, M.; HIBBS, J.; BONETTI, E.J.; BOEHME, C.C.; NOTOMI, T.; PERKINS, M.D.; SCHRENZEL, J. 2011. Robustness of a loop mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, 62: 41–48.

- GHOSH, R.; TARAFDAR, A.; SHARMA, M. 2017. Rapid and sensitive diagnoses of dry root rot pathogen of chickpea (*Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butler) using loop-mediated isothermal amplification assay. **Scientific Reports**, 7: 42737.
- GOTO, M.; HONDA, E.; OGURA, A.; NOMOTO, A.; HANAKI, K. 2009. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. **BioTechniques**, 46: 167–172.
- GUIMARÃES, M.R.F.; SIQUEIRA, C.S.; MACHADO, J.C.; FRANÇA, S.K.S.; GUIMARÃES, G.C. 2017. Evaluation of inoculum potential of pathogens in seeds: relation to physiological quality and DNA quantification by qPCR. **Journal of Seed Science**, 39: 224-233.
- LE, D.T.; VU, N.T. 2017. Progress of loop-mediated isothermal amplification technique in molecular diagnosis of plant diseases. **Applied Biological Chemistry**, 60: 169–180.
- LU, C.; SONG, B.; ZHANG, H.; WANG, Y.; ZHENG, X. 2015. Rapid Diagnosis of soybean seedling blight caused by *Rhizoctonia solani* and soybean charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* using LAMP assays. **Phytopathology**, 105: 1612–1617.
- NOTOMI, T.; OKAYAMA, H.; MASUBUCHI, H.; YONEKAWA, T.; WATANABE, K.; AMINO, N.; HASE, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, 28: e63.
- ORTEGA, S.F.; TOMLINSON, J.; GILARD, G.; SPADARO, D.; GULLINO, M.L.; GARIBALDI, A.; BROONHAM, N. 2018. Rapid detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on soil, lettuce seeds and plants using loop-mediated isothermal amplification. **Plant Pathology**, 67: 1462-1473.
- PATEL J.S.; BRENNAN, M.S.; KHAN, A.; ALI, G.S. 2015. Implementation of loop-mediated isothermal amplification methods in lateral flow devices for the detection of *Rhizoctonia solani*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 37: 118-129.
- ROCHA, D.C.; OLIVEIRA, M.B.; FREITAS, M.A.; PETROFEZA, S. 2017. Rapid detection of *Macrophomina phaseolina* in common bean seeds using a visual loop mediated isothermal amplification assay. **Australasian Plant Pathology**, 46: 205-2012.
- SARTORATO, A.; RAVA, C.A. 2003. Controle químico da mancha angular do feijoeiro comum. **Summa Phytopathologica**, 29, 202-204.

TOMITA, N.; MORI, Y.; KANDA, H.; NOTOMI, T. 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. **Nature Protocols**, 3: 877–882.

TOMLINSON, J.; BOONHAM, N. 2008. Potential of LAMP for detection of plant pathogens. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, 3: 1-7.

VIEIRA, E.H.N.; RAVA, C.A. 2000. **Sementes de feijão: produção e tecnologia**. EMBRAPA. Santo Antônio de Goiás. EMBRAPA Arroz e Feijão, ed. 1, 270 p.

CAPÍTULO II

Desinfestação anaeróbica do solo reduz a viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*

RESUMO

A desinfestação anaeróbica do solo (DAS) tem sido usada para o manejo de vários fitopatógenos, incluindo fungos formadores de escleródios. Contudo, pouco se sabe sobre o efeito da técnica no controle do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, importante patógeno da cultura do feijão. Neste trabalho, avaliamos o efeito da DAS na redução da viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum* em condições de campo. Escleródios de *Stromatinia cepivora* também foram submetidos à DAS para comparação. Farelo de soja, farelo de arroz e casca de soja foram usados como fontes de carbono, em doses equivalentes a 9 ton/ha. As fontes de carbono foram incorporadas a 30 cm de profundidade. Bolsas de poliéster contendo 10 escleródios foram enterradas a 10 cm de profundidade em parcelas de 1 m². O campo foi irrigado até saturação, seguido da cobertura da superfície do solo com plástico impermeável de cor preta. Parcelas cobertas com plástico transparente de 150 µm (solarização) e parcelas sem adição de fonte de carbono e não cobertas foram usadas como controle. O solo permaneceu coberto por 3 semanas e a germinação de escleródios foi avaliada em laboratório. A DAS com farelo de soja reduziu em 40% a viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum* e a de escleródios de *S. cepivora* em 52,5%. A desinfestação anaeróbica do solo por três semanas reduz a viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum*, principalmente usando farelo de arroz como fonte de carbono.

Palavras-chave: Controle de doenças de plantas, desinfestação biológica do solo, fungos habitantes de solo, mofo branco.

ABSTRACT

Anaerobic soil disinfestation (DAS) has been used for the management of various plant pathogens, including sclerotia-forming fungi. However, little is known about the effect of the technique on the control of the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, an important pathogen of common bean. In this work, we evaluated the effect of DAS on the reduction of the viability of *S. sclerotiorum* sclerotia under field conditions. *Stromatinia cepivora* sclerotia were also submitted to DAS for comparison. Soybean bran, rice bran and soybean hulls were used as carbon sources at doses equivalent to 9 tons / ha. The carbon sources were incorporated at 30 cm depth. Polyester bags containing 10 sclerotia were buried at 10 cm depth in 1 m² plots. The field was irrigated to saturation, followed by covering the soil surface with oxygen-proof black tarp. Plots covered with 150 µm clear plastic (solarization) and non-covered plots without carbon source were used as controls. The soil remained covered for 3 weeks and sclerotia germination was evaluated in the laboratory. DAS using rice bran reduced by 40% the viability of *S. sclerotiorum* sclerotia and of *S. cepivora* sclerotia by 52.5%. Anaerobic soil disinfestation for three weeks reduces the viability of *S. sclerotiorum* sclerotia, mainly using rice bran as a carbon source.

Keywords: Control of plant diseases, biological soil disinfestation, soil-borne pathogens, white mold.

1. INTRODUÇÃO

A presença de patógenos no solo compromete o desenvolvimento de cultivos agrícolas, reduz a produtividade e aumenta os custos de produção. O manejo de patógenos habitantes de solo é um dos gargalos da produção agrícola, principalmente quando tais organismos possuem capacidade de sobreviver por longos períodos na ausência de hospedeiros, em função da formação de estruturas de resistência, a exemplos dos escleródios (Michereff et al., 2005; Rocha & Carneiro, 2016). Escleródios são agregações de hifas, com camadas celulares melanizadas e que garantem proteção de condições adversas e de degradação microbiana (Brustolin et al., 2016).

Sclerotinia sclerotiorum é um exemplo de fitopatógeno com relevância econômica e que sobrevive no solo por aproximadamente 10 anos na forma de escleródios. O fungo causa a doença conhecida como mofo branco em mais de 400 espécies vegetais, incluindo feijão, soja e tomate. É um patógeno necrotrófico, infecta diferentes partes das plantas, causando podridão nos tecidos colonizados devido à secreção de enzimas e ácidos orgânicos (Xu et al., 2018). Os escleródios podem germinar formando micélio ou apotécio, corpo de frutificação contendo ascos e ascósporos (Godoy et al., 2017).

O manejo de patógenos de solo, tal qual *S. sclerotiorum*, por meio de fumigantes químicos tem sofrido restrições ao longo dos anos, em razão de toxicidade elevada, custos e danos ao meio ambiente. Neste sentido, a busca por métodos eficazes no manejo de patógenos e que causem menor impacto ambiental tem intensificado. Solarização e biofumigação são técnicas estudadas e usadas no campo para o controle de fungos de solo (Brown & Morra, 1997; Katan & Gamliel, 2011). Na solarização, o solo úmido permanece coberto por algumas semanas com plástico transparente e o aquecimento das camadas superficiais do solo causa a morte ou o enfraquecimento de fitopatógenos (Katan & Gamliel, 2011). Na biofumigação, resíduos orgânicos, principalmente de brássicas, são incorporados ao solo úmido, seguido da cobertura do solo para aprisionar os gases tóxicos aos fitopatógenos, principalmente isotiocianatos (Brown & Morra, 1997).

No início do ano 2000, pesquisadores no Japão e na Holanda publicaram seus estudos sobre uma nova técnica biológica para fumigação do solo. Trata-

se da desinfestação anaeróbica do solo (DAS) ou desinfestação biológica do solo (Blok et al., 2000; Shinmura, 2000; Shinmura, 2004). Nesse método, materiais orgânicos facilmente decomponíveis (relação C:N de 8-20:1) são incorporados ao solo, seguido de irrigação até saturação e cobertura do solo com plástico impermeável (Roskopf et al., 2014; Shennan et al., 2014). As condições anaeróbicas formadas no solo, em função da redução do oxigênio disponível no ambiente, estimulam a atividade de microrganismos anaeróbicos facultativos (Roskopf et al., 2014; Shennan et al., 2014; Shrestha et al., 2016). O controle de fitopatógenos ocorre em função da combinação entre acúmulo de produtos tóxicos da decomposição anaeróbica, antagonismo exercido por organismos anaeróbicos e falta de oxigênio (Runia et al., 2014; Shennan et al., 2014; Strauss & Kluepfel, 2015).

Shrestha et al. (2016) publicaram um artigo de metanálise que revelou que o controle de bactérias, oomicetos e patógenos fúngicos com uso da DAS varia entre 59 e 64%. No entanto, o número de pesquisas disponíveis envolvendo *S. sclerotiorum* é relativamente baixo, principalmente se comparado com outros fungos, tais como espécies de *Fusarium*, *Verticillium* e *Rhizoctonia* é abundante na literatura (Strauss & Kluepfel, 2015; Shrestha et al., 2016). Assim, torna-se necessário avaliar se a DAS pode ser usada no manejo de *S. sclerotiorum*. Buscando colaborar no preenchimento dessa lacuna de conhecimento, avaliou-se neste trabalho o potencial da DAS na redução de viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum* em condições de campo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no município de Tiros, Minas Gerais (latitude 18°49'14"S e longitude 45°47'50"W) em novembro de 2018. O preparo do solo foi convencional, com duas arações e uma gradagem. Nove canteiros de 1 m² foram delimitadas na área experimental (Figura 1). Os escleródios de *S. sclerotiorum* e *Stromatinia cepivorum* foram obtidos no Laboratório da COOPACER, após cultivo em meio batata dextrose ágar (BDA) + ácido láctico 4,5% por 30 dias. Amostras de solo foram coletadas na área experimental antes e depois da aplicação dos tratamentos, com o objetivo de analisar variações químicas do solo, principalmente pH, macro e micronutrientes e matéria orgânica. Para isso, amostras de 100 a 200 g de solo foram coletadas em cada parcela com uso de trado holandês até 30 cm de profundidade e formaram amostras compostas, que foram analisadas em laboratório comercial.

Quinze escleródios de *S. sclerotiorum* ou *S. cepivora* foram colocados em bolsas de poliéster (8 x 8 cm, com fibras internas de 0,04 mm²), que foram dobradas e fechadas com uso de fio dental (Figura 1). Escleródios de *S. cepivora* foram incluídos neste trabalho porque também são estruturas eficientes de sobrevivência e é um fungo relacionado filogeneticamente com *S. sclerotiorum* (Lourenço Júnior et al., 2018).

Farelo de arroz, farelo de soja, casca de soja foram usados como fontes de carbono na DAS, com cobertura do solo com plástico preto impermeável. Os mesmos materiais orgânicos foram incorporados ao solo, mas sem cobertura com plástico, para comparação. Além disso, parcelas submetidas à solarização com plástico transparente de 150 µm, parcelas cobertas com plástico preto impermeável e sem incorporação de materiais orgânicos e parcelas não cobertas e sem fonte adicional de carbono orgânico foram usadas como controle, totalizando nove tratamentos, distribuídos em quatro blocos.

As fontes foram incorporadas a 30 cm de profundidade. As bolsas contendo os escleródios foram enterradas a 10 cm de profundidade, o solo foi irrigado até a capacidade de campo. As parcelas foram cobertas com plástico preto (DAS) ou transparente (solarização) e as bordas foram devidamente enterradas, para evitar entrada de ar ou perda de calor. Após 21 dias, as bolsas

contendo os escleródios foram removidas do solo e mantidas em geladeira até análise.

Dez escleródios de cada bolsa foram desinfestados superficialmente em solução de etanol (70%) por 1 minuto, imersos em hipoclorito de sódio (1%) por 3 minutos, enxaguados em água destilada autoclavada e transferidos para placa de Petri com meio BDA com ácido láctico (4,5%), incubados em BOD a 20°C por sete dias. Os escleródios de *S. cepivora* foram colocados em meio BDA contendo extrato de alho 20% (m:v) e incubados a 16°C por sete dias. A contagem de escleródios germinados foi realizada ao final do período de incubação, considerando o crescimento micelial e observação de características morfológicas no microscópio ótico.



Figura 1. Bolsa de poliéster contendo escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* ou *Stromatinia cepivora* (A). Visão geral da área experimental, com parcelas de 1 x 1 m², cobertas ou não com plástico preto ou transparente (B).

O delineamento experimental foi do tipo blocos ao acaso, com quatro repetições. Os dados foram submetidos a análise de variância ($p < 0,05$) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) com uso do software R versão 3.6.0 (R Development Core Team, 2019).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A desinfestação anaeróbica do solo por três semanas usando farelo de arroz reduziu em 40% o número de escleródios viáveis de *S. sclerotiorum* no solo (Figura 2) e em 52,5% os de *S. cepivora* (Figura 3) em relação ao controle. A DAS com farelo de soja reduziu em 37,5% o número de escleródios viáveis de *S. cepivora* (Figura 3), mas não teve efeito significativo sobre os escleródios de *S. sclerotiorum* (Figura 2). Apenas incorporar farelo de soja, farelo de arroz ou casca de soja ao solo não reduziu a viabilidade de escleródios de nenhum dos dois fungos, assim como a solarização com plástico transparente de 150 µm e ou a cobertura do solo com plástico preto (Figuras 2 e 3).

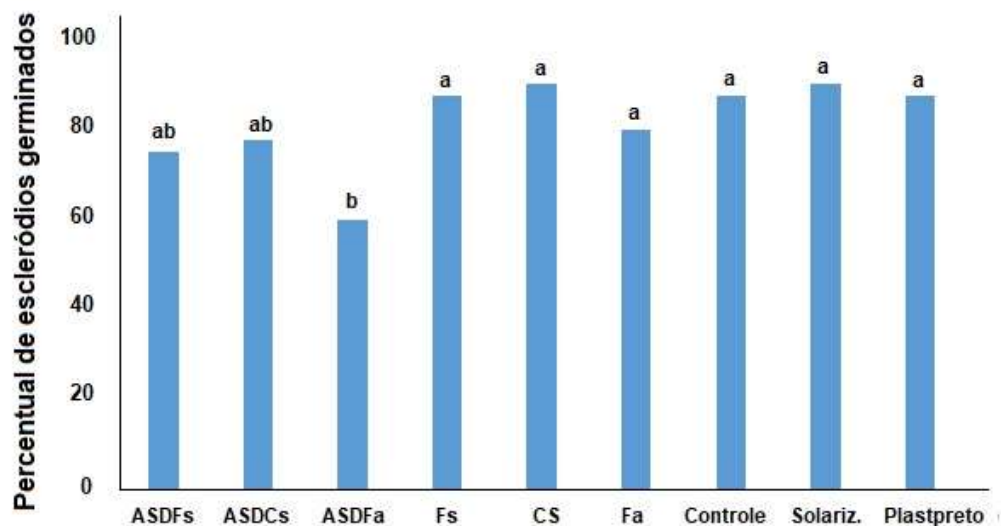


Figura 2 - Percentual de germinação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* submetidos à desinfestação anaeróbica do solo por três semanas usando farelo de soja (ASDFs), casca de soja (ASDCs) ou farelo de arroz (ASDFs) como fontes de carbono, em comparação com a incorporação ao solo de farelo de soja (Fs), casca de soja (Cs) ou farelo de arroz (Fa), controle sem material orgânico e sem cobertura de solo, solarização com plástico transparente de 150 µm (Solariz.) e cobertura do solo com plástico preto sem adição de resíduos orgânicos (Plastpreto). Médias com letras iguais sobre as barras não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). C.V. (%) = 9,68.

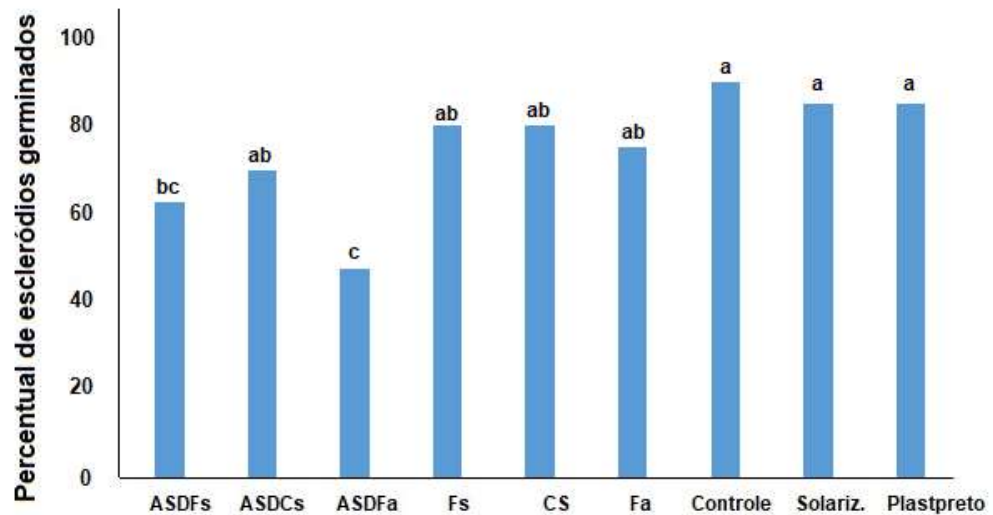


Figura 3 - Percentual de germinação de escleródios de *Stromatinia cepivora* submetidos à desinfestação anaeróbica do solo por três semanas usando farelo de soja (ASDFs), casca de soja (ASDCs) ou farelo de arroz (ASDFs) como fontes de carbono, em comparação com a incorporação ao solo de farelo de soja (Fs), casca de soja (Cs) ou farelo de arroz (Fa), controle sem material orgânico e sem cobertura de solo, solarização com plástico transparente de 150 μ m (Solariz.) e cobertura do solo com plástico preto sem adição de resíduos orgânicos (Plastpreto). Médias com letras iguais sobre as barras não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). C.V. (%) = 11,6.

Embora seja possível controlar patógenos habitantes de solo com a incorporação de materiais orgânicos no solo (Oka, 2010) ou com solarização (Katan & Gamliel, 2011), a quantidade de material incorporado no solo neste experimento pode não ter sido suficiente para liberar compostos fungitóxicos e, ou estimular a microbiota anaeróbica antagonista. Além disso, a solarização por apenas três semanas possivelmente não foi eficaz em manter o solo em temperaturas superiores a 60 - 70 °C, que podem inviabilizar ou enfraquecer os escleródios de *S. sclerotiorum* (Singh et al., 1985). Dados de temperatura de solo não foram coletados no experimento, mas considerando que o experimento foi conduzido no verão, é pouco provável que temperaturas acima de 60 °C não tenham sido alcançadas em camadas superficiais. No entanto, a manutenção do solo aquecido pode ter sido por um período curto (Katan & Gamliel, 2011). Ao contrário da solarização, a DAS não depende da ocorrência de temperaturas elevadas no solo para reduzir a viabilidade de fitopatógenos (Strauss & Kluepfel,

2015). Todavia, temperaturas mais baixas reduzem a eficiência da DAS, o que requer aumentar o período de incubação (Butler et al., 2014b). A temperatura ideal para a DAS varia entre 16-30 °C (Butler et al., 2014b).

A desinfestação anaeróbica do solo com farelo de arroz foi a mais eficiente na redução da viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum* e *S. cepivora*. O efeito supressor da DAS com essa fonte de carbono já havia sido reportado para *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani*, *Pratylenchus penetrans*, *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum*, *Agrobacterium tumefaciens* e *Athelia rolfsii* (*Sclerotium rolfsii*) (Shennan et al., 2010; Hewavitharana et al., 2014; Strauss et al., 2015; Shrestha et al., 2018). Além do pouco conhecimento até então sobre a ação da ASD com farelo de arroz na redução da viabilidade dos fungos estudados neste trabalho, a dose que usamos foi inferior aquelas reportadas em pesquisas anteriores, que variaram entre 10,8 a 20,2 ton/ha, e o período de incubação variou entre duas (Hewavitharana et al., 2014) sete semanas (Strauss et al., 2015).

A DAS pode ser tão eficiente no manejo de fitopatógenos como fumigantes químicos, incluindo brometo de metila (Butler et al., 2012a). No entanto, a eficiência da técnica depende de vários fatores, incluindo material usado como tipo e doses de fonte de carbono, tempo de incubação, alvo a ser controlado e sua densidade no solo e tipo de plástico usado para cobertura do solo em campo (Strauss & Kluepfel, 2015; Shrestha et al., 2016). A escolha das fontes e doses de materiais orgânicos usadas neste trabalho foram baseadas na disponibilidade na região, doses de carbono variando de 0,3 a 9 kg por m² e materiais com relação C:N inferior ou igual a 20:1 (Shrestha et al., 2016) que proporcionam controle germinativo. As relações C:N do farelo de soja e da casca de soja foram de 4,8:1 e a do farelo de soja foi de 20:1, determinadas em laboratório. Shrestha et al. (2018) demonstraram que relações C:N de 10:1 a 40:1 são eficazes na redução da germinação de escleródios e na colonização por microrganismos benéficos. É possível que a relação C:N do farelo de arroz dentro da faixa de 10:1 a 40:1 seja um fator que explique a maior eficiência dessa fonte de carbono na redução da viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum* e *S. cepivora*. Escleródios coletados em áreas submetidas a DAS tiveram maior colonização por fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus*, mesmo após desinfestação superficial com hipoclorito de sódio (dados não apresentados). A DAS altera a composição das comunidades microbianas do solo (van Agtmaal

et al., 2015). e essa mudança é influenciada pela fonte de carbono orgânico incorporada ao solo (Guo et al., 2017). Por exemplo, o farelo de arroz favorece o aumento da população de bactérias do filo Acidobacteria e do gênero *Burkholderia* (Strauss & Kluepfel, 2015).

Escleródios de *S. cepivora* foram usados como comparação neste experimento por causa da relação filogenética dessa espécie com *S. sclerotiorum* e por serem capazes de garantir a sobrevivência do fungo no solo por períodos duas a três vezes maiores do que os relatados para *S. sclerotiorum*, embora sejam bem menores (Lourenço Júnior et al., 2018). Além disso, pouco se sabe sobre o potencial da DAS sobre *S. cepivora* (Shrestha et al., 2016). A maior redução da viabilidade de *S. cepivora* em relação a *S. sclerotiorum* neste trabalho pode ser explicado pela natureza dos escleródios usados. Escleródios formados em laboratório são menores do que os comumente encontrados em campo, possuem quantidade menor de polissacarídeos e proteínas na sua camada interna, além do manto estomático menos denso. Experimentos usando escleródios de *S. cepivora* formados em plantas suscetíveis são necessários para validar a DAS com farelo de arroz como medida de redução da densidade de inóculo desse patógeno em áreas infestadas.

As propriedades químicas, físicas e biológicas do solo podem ser alteradas em solo submetido à DAS. Em alguns casos, pode ocorrer aumento nos teores de fósforo e potássio no solo, redução do pH, aumento da CTC e aumento do teor de micronutrientes. Essas alterações ocorrem principalmente pela inundação do solo e atividade microbiana (Butler et al., 2014a). No presente estudo, observamos que a DAS aumentou a disponibilidade de fósforo e potássio. No entanto, como o objetivo deste trabalho não visava estudar as propriedades químicas do solo e apenas uma amostra composta antes e depois da aplicação de cada tratamento foi coletada, não podemos concluir se tais alterações foram significativas e decorrentes da DAS, conforme observado por outros cientistas (Butler et al., 2014a). Fósforo e potássio são nutrientes fundamentais para o crescimento vegetal e a liberação desses nutrientes para uso das plantas em decorrência da DAS, caso aconteça, melhoraria a nutrição das culturas e as tornariam mais tolerantes ao ataque de patógenos.

O potencial da desinfestação anaeróbica do solo com farelo de arroz deve ser avaliado em experimentos futuros em áreas naturalmente infestadas e que devem ser cultivadas com feijão, soja ou outra cultura suscetível ao patógeno.

Além disso, seria relevante avaliar como as eventuais alterações químicas e biológicas do solo após DAS poderiam influenciar o controle de *S. sclerotiorum* e a produção da cultura.

4. CONCLUSÕES

A desinfestação anaeróbica do solo por três semanas usando farelo de arroz, na taxa de 9 ton/ha, reduz o número de escleródios viáveis de *S. sclerotiorum* e *S. cepivora* no solo. Solarização com plástico transparente de 150 µm por três semanas não reduz a viabilidade de ambos os fungos. A desinfestação anaeróbica do solo é uma técnica promissora para reduzir o potencial de inóculo de *S. sclerotiorum* e *S. cepivora*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLOK, W.J.; LAMERS, J.G.; TERMORSHUIZEN, A.J.; BOLLEN, G.J. 2000. Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. **Phytopathology**, 90: 253–259.

BROWN, P.D.; MORRA, M.J. 1997. Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants. In: SPARKS, D.L. (Ed). **Advances in Agronomy**. Academic Press: San Diego, pp. 167-215.

BRUSTOLIN, R.; REIS, E.M.; PEDRON, L. 2016. Longevity of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia on the soil surface under field conditions. **Summa Phytopathologica**, 42: 172-174.

BUTLER, D.M.; KOKALIS-BURELLE, N.; ALBANO, J.P.; McCOLLUM, T.G.; MURAMOTO, J.; SHENNAN, C.; ROSSKOPF, E.N. 2014a. Anaerobic soil disinfestation (ASD) combined with soil solarization as a methyl bromide alternative: Vegetable crop performance and soil nutrient dynamics. **Plant and Soil**, 378: 365–381.

BUTLER, D.; OWNLEY, B.; DEE, M.; EICHLER, S.; McCARTY, D.; SHRESTHA, U.; KOKALIS-BURELLE, N.; ROSSKOPF, E. 2014b. Low carbon amendment rates during anaerobic soil disinfestation (ASD) at moderate soil temperatures do not decrease viability of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia or *Fusarium* root rot of common bean. **Acta Horticulturae**, 1044: 203-208.

GODOY, C.V.; KOGA, L.J.; OLIVEIRA, M.C.N.; HILL, C.B.; HARTMAN, G.L. 2017. Mycelial growth, pathogenicity, aggressiveness and apothecial development of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Brazil and the United States in contrasting temperature regimes. **Summa Phytopathologica**, 43: 263-268.

GUO, H.; DI GIOLA, F.; ZHAO, X.; OZORES-HAMPTON, M.; SWISHER, M.E.; HONG, J.; KOKALIS-BURELLE, N.; DELONG, A.N. 2017. Optimizing anaerobic soil disinfestation for fresh market tomato production: Nematode and weed control, yield, and fruit quality. **Scientia Horticulturae**, 218: 105-116.

- HEWAVITHARANA, S.S.; RUDDELL, D.; MAZZOLA, M. 2014. Carbon-source-dependent antifungal and nematicidal volatiles derived during anaerobic soil disinfestation. **European Journal of Plant Pathology**, 140: 39-52.
- KATAN, J.; GAMLIEL, A. 2011. Soilborne diseases, control by physical methods. In: GLINSKI, J.; HORABIK, J.; LIPIEC, J. (Eds). **Encyclopedia of Agrophysics**. Springer: Amsterdam, pp. 813-816.
- LOURENÇO JÚNIOR, VIEIRA, B.S.; LOPES, E.A.; VILLALTA, O.N. 2018. Etiology, epidemiology, and management of white rot on onion and garlic: current knowledge and future directions for Brazil. **Científica**, 46, 241-256.
- MICHEREFF, S.J.; ANDRADE, D.E.G.T.; MENEZES, M. 2005. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Imprensa Universitária: Recife, 398 p.
- OKA, Y. 2010. Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments: a review. **Applied Soil Ecology**, 44: 101e115.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2017. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- ROCHA, G.A.; CARNEIRO, L.C. 2016. Solarização do solo associado à incorporação de material orgânico na redução da viabilidade de escleródios. **Revista de Ciências Agroambientais**, 14: 10-17.
- ROSSKOPF, E.N.; BURELLE, N.; HONG, J.; BUTLER, D.M.; NOLING, J.W.; HE, Z.; BOOKER, B.; SANCES, S. 2014. Comparison of anaerobic soil disinfestation and drip-applied organic acids for raised-bed specialty crop production in Florida. **Acta Horticulturae**, 1044: 221–228.
- RUNIA, W.T.; THODEN, T.C.; MOLENDIJK, L.P.G.; van den BERG, W.; TERMORSHUIZEN, A.J.; STREMIŃSKA, M.A.; van der WURFF, A.W.G.; FEIL, H.; MEINTS, H. 2014. Unravelling the mechanism of pathogen inactivation during anaerobic soil disinfestation. **Acta Horticulturae**, 1044: 177–193.
- SHENNAN, C.; MURAMOTO, J.; KOIKE, S.T.; DAUGOVISH, O. 2010. Optimizing anaerobic soil disinfestation for non-fumigated strawberry production in California. **California Strawberry Commission Annual Production Research Report 2010– 2011**: 113–121.

SHENNAN, C.; MURAMOTO, J.; LAMERS, J.; MAZZOLA, M.; ROSSKOPF, E.N.; KOKALIS-BURELLE, N.; MOMMA, N.; BUTLER, D.M.; KOBARA, Y. 2014. Anaerobic soil disinfestation for soil borne disease control in strawberry and vegetable systems: current knowledge and future directions. **Acta Horticulturae**, 1044: 165–175.

SHINMURA, A. 2000. Causal agent and control of root rot of welsh onion. **PSJ Soilborne Disease Workshop Report**, 20: 133-143.

SHINMURA, A. 2004. Principle and effect of soil sterilization method by reducing redox potential of soil. **PSJ Soilborne Disease Workshop Report**, 22: 2–12.

SHRESTHA, U.; AUGÉ, R.M.; BUTLER, D.M. 2016. A meta-analysis of the impact of anaerobic soil disinfestation on pest suppression and yield of horticultural crops. **Frontiers in Plant Science**, 7: 1254, Article 1254.

SHRESTHA, U.; DEE, M.E.; OWNLEY, B.H.; BUTLER, D.M. 2018. Anaerobic soil disinfestation reduces germination and affects colonization of *Sclerotium rolfsii* sclerotia. **Phytopathology**, 108: 342-351.

SING, U.P.; SING, R.B.; GUPTA, S. 1985. Effect of temperature on sclerotial germination, growth and sclerotia germination in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Plant Diseases and Protection**, 92: 281-287.

STRAUSS, S.L.; KLUEPFEL, D.A. 2015. Anaerobic soil disinfestation: A chemical-independent approach to pre-plant control of plant pathogens. **Journal of Integrative Agriculture**, 14: 2309-2318.

STRAUSS, S.L.; STOVER, J.K.; KLUEPFEL, D.A. 2015. Impact of biological amendments on *Agrobacterium tumefaciens* survival in soil. **Applied Soil Ecology**, 87: 39–48.

Van AGTMAAL, M.; van OS, G.J.; HOL, W.H.G.; HUNDSCHIED, M.P.J.; RUNIA, W.T.; HORDIJK, C.A.; BOER, W. 2015. Legacy effects of anaerobic soil disinfestation on soil bacterial community composition and production of pathogen-suppressing volatiles. **Frontiers in Microbiology**, 6: 701.

XU, L.; LI, G.; JIANG, D.; CHEN, W. 2018. *Sclerotinia sclerotiorum*: An evaluation of virulence theories. **Annual Review of Phytopathology**, 56: 311-338.