

Neon-S, novo meio para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes*

Reginaldo Napoleão¹, Luiz Nasser², Carlos Lopes³, Adalberto Café Filho⁴

¹Faculdades Federais Integradas de Diamantina, Rua da Glória, 187, Centro, 39100-000, Diamantina, MG <reginaldonapoleao@yahoo.com.br>; ²Embrapa Sede, Mapa, Departamento de Fitopatologia, UnB <luiznasser@agricultura.gov.br>; ³Embrapa Hortaliças, C.P. 218, 79359-970, Brasília, DF <clopes@cnph.embrapa.br>; ⁴Universidade de Brasília, Departamento de Fitopatologia, Campus Universitário, 70790-900, Brasília, DF <cafeilh@unb.br>.

* Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor. Universidade de Brasília, 2001.

Autor para correspondência: Reginaldo Napoleão.

Data de chegada: 01/12/2004. Aceito para publicação em: 06/07/2005.

1150

ABSTRACT

Napoleão, R.; Nasser, L.C.B.; Lopes, C.A.; Café Filho, A.C. Neon-S, a new medium for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on seeds. *Summa Phytopathologica*, v.32, n.2, p.180-182, 2006.

Neon medium, originally proposed to verify the viability of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*, suffered modification aiming to detect the pathogen on seeds. A wide-ranged antibiotic and a form of 2,4-D acid that could withstand sterilization were incorporated in the new medium. The ideal concentration of blue bromophenol and the best light and temperature conditions for incubation of seeds on this medium were verified. All ingredients of the new medium were

added before sterilization and pH adjustment was unnecessary. This medium, named Neon-S, was compared to the methods recommended for the detection pathogens on seeds by the Brazilian Ministry of Agriculture. Compared to the filter paper test and the germination paper test, the method was faster and more efficient, by reducing the detection time of the pathogen from 37 days to 12 days.

Additional keywords: Seed pathology; white mold; *Phaseolus vulgaris*, seed analysis.

RESUMO

Napoleão R., Nasser, L.C.B., Lopes, C.A.; Café Filho, A.C. Neon-S, novo meio para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes. *Summa Phytopathologica*, v.32, n.2, p.180-182, 2006.

O meio Neon, desenvolvido para verificar a viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, foi modificado e denominado de Neon-S com o objetivo de detectar o patógeno em sementes. Um antibiótico de amplo espectro e uma forma do ácido 2,4 D que suportassem a autoclavagem foram incorporados ao novo meio. Verificaram-se a concentração ideal de azul de bromofenol e as melhores condições de luminosidade e temperatura para a incuba-

ção das sementes sobre este meio. Todos os novos ingredientes do meio foram adicionados antes da autoclavagem e o ajuste de pH foi dispensado. O Neon-S foi comparado com os métodos de detecção de patógenos em sementes recomendados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Em relação ao método do papel de filtro e do rolo de papel, o do presente trabalho foi mais rápido e eficiente, reduzindo o tempo de detecção de 37 dias para 12 dias.

Palavras-chave adicionais: Patologia de sementes; mofo-branco; *Phaseolus vulgaris*, análise de sementes.

O patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary pode sobreviver em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) por mais de três anos (7). Os testes oficiais para detecção desse fungo em sementes, recomendados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Mapa) demandam 37 dias.

Alguns trabalhos em que se utilizaram meios de cultura semi-seletivos, contendo o indicador de pH azul de bromofenol, indicavam ser possível reduzir o tempo de detecção do patógeno (3, 5, 6). O ácido oxálico produzido pelo fungo altera a cor do meio

de cultura de azul para amarela. O meio Neon, desenvolvido por Nasser *et. al.* (4), foi utilizado por Peres *et. al.* (5) para detectar *S. sclerotiorum* em sementes, mas o seu preparo requer manuseio após a esterilização.

O objetivo deste trabalho foi modificar o meio Neon para facilitar a sua preparação, detectar precocemente o patógeno em sementes e compará-lo com os métodos oficialmente recomendados pelo Mapa.

O cloranfenicol foi o antibiótico selecionado para compor o

Neon-S por apresentar amplo espectro de ação e ponto de fusão entre 105 °C e 151,5 °C. A forma escolhida do 2,4-D foi a de ácido livre, cujo ponto de fusão é de 140 °C. O azul de bromofenol decompõe-se a 279 °C.

A sensibilidade do azul de bromofenol à presença de ácido foi avaliada em água destilada nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 mg/L na presença de ácido clorídrico 1N, 0,4 mL HCl/25 mL da solução, suficiente para alterar a cor do indicador e, 1,0 mL de HCl/25 mL da solução (excesso de ácido). A cor resultante foi lida em espectrofotômetro a 500 nm e comparada com Carta de Munsell (2). Em meio sólido e nas mesmas concentrações, com pH ajustado para 4,6, a sensibilidade do indicador foi avaliada na presença do fungo a 19 °C ± 1 °C no escuro.

Houve uma correlação positiva e significativa ($P \leq 1\%$) da absorbância com a concentração de azul de bromofenol (Figura 1).

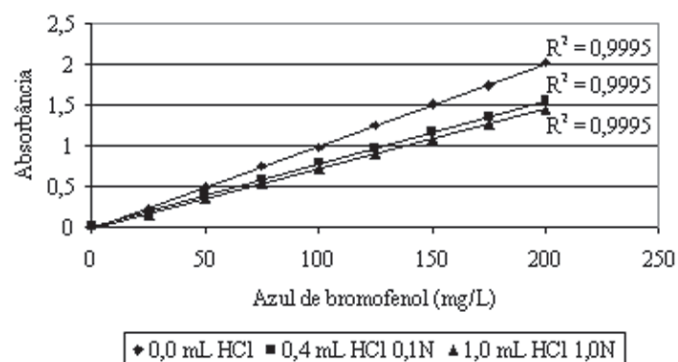


Figura 1. Absorbância a 500 nm das soluções com concentração crescente de azul de bromofenol e adição de HCl.

Verificou-se que, apenas nas soluções com concentrações de 25 a 100 mg por litro, o matiz das cores continha apenas o pigmento amarelo. No meio sólido a formação do halo amarelo em torno do disco de micélio não diferiu estatisticamente ($P \leq 1\%$) em nenhuma das concentrações, por isso, optou-se por utilizar 50 mg/L de azul de bromofenol ao novo meio.

A necessidade de ajuste de pH do meio, após a sua esterilização, foi avaliada na presença fungo em meio BDA contendo: 50 mg de azul de bromofenol, 50 mg de cloranfenicol e 50 mg de ácido livre 2,4-D; o pH ajustado foi de 4,6 e sem ajuste 5,6.

A velocidade de formação do halo amarelo em torno dos discos de BDA contendo micélio do fungo não diferiu estatisticamente ($P \leq 1\%$) em função do ajuste de pH do meio, dispensando assim essa etapa da preparação.

Os regimes de luz e de temperatura mais adequados foram avaliados mantendo-se as placas de Petri, contendo o meio e o fungo, sob luz constante, fotoperíodo de 12 horas e, escuro constante. As temperaturas foram de 19 °C ± 1 °C e temperatura ambiente (± 25 °C). O diâmetro do halo amarelo em torno dos discos de micélio foi medido a cada 24 horas até que todo o meio se tornasse amarelo.

O regime de luz e a temperatura não interferiram na velocidade de formação do halo amarelo ($P \leq 1\%$) que teve início após

24 horas de incubação e término com 80 horas. Optou-se por utilizar escuro constante e temperatura de 19 °C ± 1 °C por dificultar o desenvolvimento de outros microrganismos.

Sementes de feijão cv. Diamante Negro, natural e artificialmente infectadas, foram utilizadas para comparar o meio Neon-S com os métodos oficiais de detecção (1) de *S. sclerotiorum*.

A presença de *S. sclerotiorum* nas sementes artificialmente infectadas da cultivar de feijão Diamante Negro, começou a ser detectada no Neon-S a partir do 5º dia de incubação e prolongou-se até o 12º dia. No método do papel de filtro, apenas no 24º dia foi possível fazer a detecção, cuja porcentagem de sementes infectadas permaneceu inalterada até a avaliação final, no 37º dia. Ambos os métodos possibilitaram a detecção do patógeno, cuja porcentagem de sementes contaminadas foi de 7,75%. Nos ensaios com as sementes naturalmente infectadas o Neon-S detectou o patógeno com 10 dias de incubação. A porcentagem de sementes infectadas na repetição 1 foi de 0,75 e na repetição 2 de 1,02. Nos demais métodos, foram necessários de 21 a 30 dias de incubação. Na repetição 2, o método do papel de filtro não detectou o patógeno nas sementes infectadas (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação dos métodos de detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão naturalmente infectadas, com repetição no tempo.

Método	Repetição 1		Repetição 2	
	Detecção (dias)	% de sementes infectadas	Detecção (dias)	% de sementes infectadas
Neon-S	10	0,75	10	1,02
Papel de filtro	24	0,75	30	0,0
Rolo de papel	21	0,75	24	1,02

Desta maneira, para a detecção de *S. sclerotiorum* em sementes, a composição, o preparo e a utilização do meio Neon-S ficaram assim estabelecidos: Um litro de BDA + 50 mg de azul de bromofenol + 50 mg de cloranfenicol + 50 mg de ácido livre 2,4-D; autoclavagem a 121 °C por 20 min; incubação das sementes a 19 °C ± 1 °C no escuro e leitura feita de 7 a 12 dias.

O Neon-S, da maneira como foi preparado, sem ajuste de pH e sem que nenhum de seus constituintes fosse adicionado posteriormente à sua esterilização, facilitou a detecção de *S. sclerotiorum* em sementes, que pôde ser feita em até 12 dias. O método foi rápido, eficaz e poderá ser utilizado em detrimento dos métodos do rolo de papel e do papel de filtro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brasil. **Regras para análise de sementes.** Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Brasília-DF, 1992. 365p.
2. Kollmorgen Corporation. **Munsell soil color charts.** Baltimore,

- 1975.
3. Nasser, L.C.B.; Arancibia, R.C.; Napoleão, R. Uso do meio Neon modificado para determinação de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão produzidas em áreas irrigadas do cerrado. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, supl., p.309, 1999. (Resumo).
 4. Nasser, L.C.B.; Boland, G.J.; Sutton, J.C. Meio semi-seletivo para detecção da viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v.20, supl., p.376, 1995. (Resumo).
 5. Peres, A.P.; Nasser, L.C.B.; Machado, J.C. Use of semi-selective media for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on bean and soybean seeds. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, n. 2, p.123-127, 2002.
 6. Steadman, J.R.; Marcinkowska, J.; Rutledge, S. A semi-selective medium for isolation of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.16, n.2 ,p.68-70, 1994.
 7. Tu, J.C. The role of white mold-infected white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds in the dissemination of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.121, n.1 , p.40-50, 1998.