



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE BIODIVERSIDADE E FLORESTA
BACHARELADO INTERDISCIPLINAR EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

RENATA CARVALHO NOGUEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FISIOLÓGICA
DE ISOLADOS DE *Sclerotium delphinii* (Welch) CULTIVADOS
EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA**

SANTARÉM

2019

RENATA CARVALHO NOGUEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FISIOLÓGICA
DE ISOLADOS DE *Sclerotium delphinii* (Welch) CULTIVADOS
EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de graduação em Bacharelado Interdisciplinar em Ciências Agrárias para a obtenção grau de Bacharela em Ciências Agrárias; Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Biodiversidade e Floresta.

Orientador: Prof. Dr. Robinson Severo.

SANTARÉM

2019

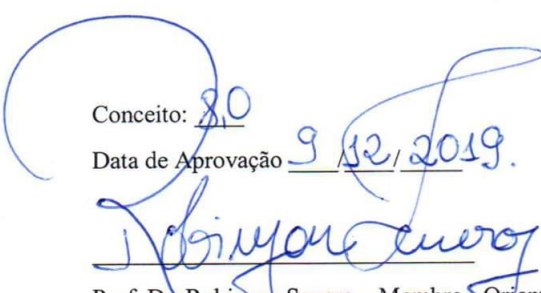
RENATA CARVALHO NOGUEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FISIOLÓGICA DE
ISOLADOS DE *Sclerotium delphinii* (Welch) CULTIVADOS EM
DIFERENTES MEIOS DE CULTURA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de graduação em Bacharelado Interdisciplinar em Ciências Agrárias para a obtenção grau de Bacharela em Ciências Agrárias; Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Biodiversidade e Floresta.

Conceito: 8,0

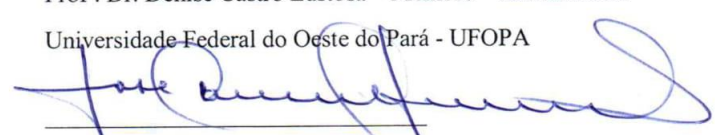
Data de Aprovação 9/12/2019.


Prof. Dr. Robinson Severo – Membro - Orientador

Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA


Profª. Dr. Denise Castro Lustosa – Membro – Examinadora

Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA


Prof. Dr. José Camilo Hurtado Guerrero

Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA

AGRADECIMENTOS

Neste momento, externo os meus agradecimentos a todos os que contribuíram para realização deste trabalho.

Assim, sou grata ao nosso bom Deus por estar sempre presente em minha vida, por ser meu refúgio na dor e encher meu coração de esperança.

Aos meus familiares, em especial minha mãe, por nunca medir esforços quando se trata da educação minha e de minha irmã. Por ser minha fortaleza, uma mulher amável e doce que diariamente me motiva a ser uma pessoa verdadeira, competente, responsável e dedicada. És minha maior inspiração e motivação.

Gostaria de registrar minha gratidão ao meu orientador Prof. Dr. Robinson Severo por toda dedicação em me orientar, por todo o apoio, incentivo, paciência e liberdade na escolha de ideias para o desenvolvimento desse trabalho, que somente foi concluído devido a sua grande motivação e insistência.

Ao meu amigo Leandro Jun Soki Shibutani que desde o início esteve presente em cada processo da criação deste trabalho me auxiliando e motivando a dar o melhor de mim, muito obrigada por toda a ajuda e paciência, sua paixão pela fitopatologia me surpreende e motiva.

RESUMO

A mancha foliar da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.), denominada de mancha zonada, é uma das mais importantes doenças nas regiões tropicais. Um dos requisitos básicos para obtenção do controle da doença é o conhecimento do patógeno, em especial, os fatores que estão ligados a fisiologia e biologia. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar algumas morfológicas e fisiológicas de cinco isolados de *Sclerotium delphinii*, obtidos da pimenta-do-reino, quanto ao crescimento micelial, produção de escleródios (maduros e imaturos), diâmetro, massa fresca e seca em cinco diferentes substratos. O experimento foi conduzido em bancadas do laboratório em condições de luz contínua e temperatura à 30°C. O fungo *S. delphinii*, dentre os cinco substratos, teve melhor desempenho em relação ao crescimento micelial para todos os isolados quanto submetido ao meio de cultura BDA. O efeito do substrato variou com o isolado em relação a produção de escleródios. O isolado SMT 7 apresentou maior produção de escleródios no substrato V8-ágar, SMT 13 teve um bom desempenho nos cinco substratos, SMT 19 também no meio V8-ágar, SMT 20 nos meios BDA e milho-ágar e SMT 32 nos substratos malte-ágar e V8-ágar. Em relação a massa fresca e seca, apesar de nos meios aveia-ágar e milho-ágar produzirem escleródios com tamanhos maiores, foram nos meios V8-ágar, BDA e malte-ágar que a massa tanto fresca como seca aferida apresentou maior valores.

PALAVRAS CHAVE: *Sclerotium delphinii*. Morfologia. fisiologia.

ABSTRACT

A leaf spot of black pepper (*Piper nigrum* L.), called spotted spot, is one of the most important diseases in climatic regions. One of the basic requirements for disease control is knowledge of the pathogen, especially the factors that are linked to physiology and biology. Therefore, the present work aimed to characterize some morphological and physiological characteristics of five individuals of sclerotic delphinii, to hear black pepper, regarding mycelial growth, multiple sclerosis production (mature and immature), fresh and dry dry mass in five different substrates. The experiment was conducted in laboratory laboratories under continuous light and temperature at 30° C. *S. delphinii* fungus, among the five substrates, had the best performance in relation to mycelial growth for all those submitted to the medium. of the BDA culture. The effect of varied or isolated substrate on the sclerotia production ratio. Isolated SMT 7 showed higher production of sclerotia in substrate V8, SMT 13 performed well in five substrates, SMT 19 also in medium V8, SMT 20 in BDA and maize and SMT 32 in malt and V8 substrates. - agar. Regarding fresh and dry mass, despite the means of maize production and maize production with larger sclerodes, it was the V8-agar, BDA and malt-agar media that both fresh and dry mass are the largest. values.

KEY WORDS: *Sclerotium delphinii*. Morphology. physiology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Micélio de textura densa, fina e rasteiro de coloração esbranquiçada das colônias dois isolados de *S. delphinii* cultivados em meio de BDA, sob condições de luz branca fluorescente constante, aos onze dias de incubação 25
- Figura 2** – (A) Escleródios imaturos de cor castanho amarelada de *S. delphinii* cultivados em meio de BDA, sob condições de luz branca fluorescente constante, aos 21 dias de incubação. (B) Escleródios maduros de coloração marrom avermelhada meio BDA, sob condições de luz branca fluorescente constante, aos 21 dias de incubação 26
- Figura 3** – Micélio rizomatoso de cor branca e textura densa/filamentosa das colônias de *S. delphinii* cultivados em, meio malte-ágar, sob condições de luz branca fluorescente constante, aos onze dias de incubação 27
- Figura 4** – (A) formação de escleródios imaturos de coloração amarelo claro de *S. delphinii* dispersa por toda área da placa sob condições de luz branca fluorescente constante aos nove dias de incubação e (B) Escleródios maduros de cor marrom escuro de *S. delphinii* sob condições de luz branca fluorescente constante aos 21 dias de incubação 27
- Figura 5** – Quatro diferentes tipos de micélio: filamentosos, com formação mais dispersa, de textura não densa e textura mais densa das colônias de *S. delphinii* cultivados em, meio V8-ágar, sob condições de luz branca fluorescente constante, aos onze dias de incubação 28
- Figura 6** – (A) Escleródios de cor esbranquiça e amarelo claro imaturos de *S. delphinii* cultivados em meio de cultura V8-ágar, sob condições de luz branca fluorescente constante, aos 8 dias de incubação e (B) Escleródios marrom avermelhados e castanho escuro maduros de *S. delphinii* em meio de cultura V8-ágar aos 21 dias de incubação 29
- Figura 7** – micélio de textura densa, rastejante e de cor branca das colônias de *S. delphinii*, cultivados em meio milho-ágar, sob condições de luz branca fluorescente constante, aos onze dias de incubação 30
- Figura 8** – (A) Esclerócios imaturos de formato irregular e coloração amarelada de *S. delphinii* cultivados em meio de cultura milho-ágar em condições de luminosidade fluorescente branca constate, aos onze dias de incubação e (B) 30

Esclerócios maduros de coloração marrom escuro de <i>S. delphinii</i> em meio de cultura milho-ágar sob condições de luz branca fluorescente constante aos 21 dias de incubação	
Figura 9 – Micélio de textura cotonosa e cor branca das colônias de <i>S. delphinii</i> , cultivados em meio aveia-ágar, sob condições de luz branca fluorescente constante, aos onze dias de incubação	31
Figura 10 – (A) Alteração da cor micelial do isolado SMT 20 e escleródios imaturos de coloração creme e amarelo com formato achatado e desuniformes (B) Escleródios maduros de coloração castanho escuro de <i>S. delphinii</i> cultivados em meio aveia-ágar sob condições de luminosidade branca fluorescente constante, aos 21 dias de incubação	32
Figura 11 – Progresso do crescimento micelial das colônias do isolado SMT 7 de <i>Sclerotium delphinii</i> cultivado em diferentes meios de cultura	33
Figura 12 – Progresso do crescimento micelial das colônias do isolado SMT 13 de <i>Sclerotium delphinii</i> cultivado em diferentes meios de cultura	34
Figura 13 – Progresso do crescimento micelial das colônias do isolado SMT 19 de <i>Sclerotium delphinii</i> cultivado em diferentes meios de cultura	35
Figura 14 – Progresso do crescimento micelial das colônias do isolado SMT 20 de <i>Sclerotium delphinii</i> cultivado em diferentes meios de cultura	35
Figura 15 – Progresso do crescimento micelial das colônias do isolado SMT 32 de <i>Sclerotium delphinii</i> cultivado em diferentes meios de cultura	36
Figura 16 – Produção de escleródios imaturos do isolado SMT 7 de <i>Sclerotium delphinii</i> cultivado em diferentes meios de cultura	38
Figura 17 – Produção de escleródios maduros do isolado SMT 7 de <i>Sclerotium delphinii</i> cultivado em diferentes meios de cultura	39
Figura 18 – Produção de escleródios imaturos do isolado SMT 13 de <i>Sclerotium delphinii</i> cultivado em diferentes meios de cultura	40
Figura 19 – Produção de escleródios maduros do isolado SMT 13 de <i>Sclerotium delphinii</i> cultivado em diferentes meios de cultura	41
Figura 20 – Produção de escleródios imaturos do isolado SMT 19 de <i>Sclerotium delphinii</i> cultivado em diferentes meios de cultura	41

Figura 21 – Produção de escleródios maduros do isolado SMT 19 de <i>Sclerotium delphinii</i> cultivado em diferentes meios de cultura	42
Figura 22 – Produção de escleródios imaturos do isolado SMT 20 de <i>Sclerotium delphinii</i> cultivado em diferentes meios de cultura	43
Figura 23 – Produção de escleródios maduros do isolado SMT 20 de <i>Sclerotium delphinii</i> cultivado em diferentes meios de cultura	43
Figura 24 – Produção de escleródios imaturos do isolado SMT 32 de <i>Sclerotium delphinii</i> cultivado em diferentes meios de cultura	44
Figura 25 – Produção de escleródios maduros do isolado SMT 32 de <i>Sclerotium delphinii</i> cultivado em diferentes meios de cultura	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Crescimento micelial final das colônias (mm) de cinco isolados de <i>Sclerotium delphinii</i> cultivados em diferentes meios de cultura	32
Tabela 2 - Produção de escleródios imaturos de cinco isolados de <i>Sclerotium delphinii</i> cultivados em diferentes meios de cultura	37
Tabela 3 - Produção de escleródios maduros de cinco isolados de <i>Sclerotium delphinii</i> cultivados em diferentes meios de cultura	38
Tabela 4 – Massa fresca de escleródios maduros de cinco isolados de <i>Sclerotium delphinii</i> cultivados em diferentes meios de cultura	46
Tabela 5 – Massa seca de escleródios maduros de cinco isolados de <i>Sclerotium delphinii</i> cultivados em diferentes meios de cultura	46
Tabela 6 - Diâmetro de escleródios maduros de cinco isolados de <i>Sclerotium delphinii</i> cultivados em diferentes meios de cultura	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Importância fitopatológica de <i>Sclerotium delphinii</i>	16
2.2	Características morfológicas de <i>Sclerotium delphinii</i>	16
2.3	Características nutricionais de <i>Sclerotium</i> spp	17
2.4	Meios de cultivo de <i>Sclerotium delphinii</i>	18
3	OBJETIVOS	20
3.1	Objetivo geral	20
3.2	Objetivos específicos	20
4	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.3	Origem e produção do inóculo de <i>sclerotium delphinii</i>	21
4.4	Confecção dos meios de cultura	21
4.5	Semeadura do inóculo de <i>sclerotium delphinii</i> em meios de cultura	22
4.6	Medição do crescimento micelial em meios de cultura	22
4.7	Descrição morfológica dos isolados de <i>sclerotium delphinii</i>	23
4.8	Produção de escleródios imaturos e maduros de <i>Sclerotium delphinii</i> ...	23
4.9	Massa fresca e seca de escleródios maduros de <i>Sclerotium delphinii</i>	23
5.0	Diâmetro dos escleródios de <i>Sclerotium delphinii</i>	24
5.1	Delineamento experimental	24
5.2	Análise estatística	24
5	Resultados e discussão	24
5.1	Descrição morfológica dos isolados de <i>Sclerotium delphinii</i>	24
5.1.1	Meio de cultura de batata-dextrose-ágar	24
5.1.2	Meio de cultura extrato de malte	26
5.1.3	Meio de cultura V8-ágar	27
5.1.4	Meio de cultura milho-ágar	29

5.1.5 Meio de cultura aveia-ágar	30
5.2 Crescimento micelial do isolados de <i>Sclerotium delphinii</i>	32
5.3 Produção de massa fresca e seca de escleródios maduros de <i>Sclerotium delphinii</i>	36
5.4 Produção de massa fresca e seca de escleródios maduros de <i>Sclerotium delphinii</i>	45
5.5 Diâmetro de escleródios maduros de <i>Sclerotium delphinii</i>	46
6 CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

A mancha foliar da pimenteira-do-reino, denominada de mancha zonada, tem ocorrido de forma endêmica em lavouras comerciais nos municípios de Belém (DUARTE, 2004) e Santarém (SEVERO et al., 2018). O fungo *Sclerotium delphinii* além de causar essa mancha, é responsável por infectar sementes, plântulas e plantas maduras (MUKHERJEE et al., 2015).

Em mudas, os sintomas consistem no aparecimento de áreas encharcadas na zona do colo e murchamento da planta. Os sinais são evidentes com o crescimento micelial nas raízes e no colo do caule (MUKHERJEE et al., 2015). Existe também registro de *S. rolfsii* causando podridão-de-estacas em pimenta-do-reino. No entanto, a identificação do patógeno foi baseada apenas em características morfológicas sem antes ser feito o sequenciamento genético. Dessa forma, não se tem a certeza de qual fungo é o causador da podridão-em-estacas, pode ser *S. delphinii*, ou qualquer outra espécie do gênero *Sclerotium*. Os primeiros trabalhos de diagnose realizados por pesquisadores da EMBRAPA Amazônia Oriental identificaram *S. rolfsii* como o agente causal da doença (DUARTE, 2004).

Trabalhos de diagnose já realizados pelo Professor Robinson Severo e o Acadêmico Leandro Jun Soki Shibutani em lavoura situada na comunidade do Cipoal, município de Santarém, e no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Oeste do Pará – Campus Santarém, inicialmente, indicaram como fitopatógeno *Sclerotium* sp. (trabalho aceito para publicação nos Anais da VII Jornada Científica e Semana Integrada do IFPA, Campus de Santarém, 2018). Trabalhos posteriores de análise molecular da região ITS destes mesmos isolados, desenvolvidos pelos Professores Maruzanete Pereira de Mello (UFOPA – Campus de Juruti) e José Evando Aguiar Beserra Júnior (UFPI – Campus de Terezina) na UFPI e, de sequenciamento de DNA, desenvolvidos na Empresa Macrogen da Coréia do Sul, identificaram como *S. delphinii*. Os resultados deste trabalho foram publicados nos Anais do 51º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, realizado em 2019, em Recife, Pernambuco (SEVERO et al, 2019). Este vai ser o primeiro registro de ocorrência deste fitopatógeno causando mancha foliar no mundo.

É de fundamental importância conhecer as características biológicas de *S. delphinii*, particularmente as relacionadas a sua morfologia e fisiologia, para que estas possam viabilizar a continuidade de estudos e pesquisas aplicadas à patogenicidade, epidemiologia, resistência

vegetal e controle do patógeno, entre outras.

Neste sentido, é importante testar e avaliar a eficiência de produção de escleródios e o crescimento micelial de *S. delphinii* em diferentes meios de cultura, levando em consideração, também, o baixo custo para produzi-los.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância fitopatológica de *Sclerotium delphinii*

O fungo é um importante fitopatógeno que habita no solo e acaba infectando pelo menos 27 espécies de herbáceas ornamentais entre elas se destacam as espécies do gênero *Ajuga*, *Arachis*, *Hosta*, *Iris*, *Malus* e muitas outras. Há relatos de *Sclerotium delphinii* atacando culturas de importância agrícola como: algodão (MUKHERJEE et al., 2015), abobora (PALO, 1933), melão (TAKAHASHI, 1997) e mangueira (RODRIGUES; SANTOS FILHO, 1993). Conhecido principalmente por ser o agente causal de podridões, normalmente na região do colo e avançando pelo caule, podridão do pecíolo (causando lesões marrons e maceradas o que resulta no amarelecimento e murcha das folhas) e a mancha foliar na forma de halos concêntricos cercada por halos cloróticos (MUKHERJEE et al., 2015; XU et al., 2008; JAPONICA, 2014).

Sua distribuição geográfica ocorre principalmente em áreas frias como a China e a região norte e meio-oeste dos Estados Unidos, entretanto, em países mais quentes como o Brasil e Índia também apresentam a ocorrência do fungo. A causa desta aparente diferença na distribuição geográfica não é conhecida. É possível que diferenças regionais de temperatura afetem a sobrevivência de *S. delphinii*, influenciando assim, sua distribuição geográfica, mas nenhuma evidência para apoiar ou refutar essa hipótese foi publicada (XU et al., 2018).

2.2 Características morfológicas de *Sclerotium delphinii*

Sclerotium delphinii é pertencente à família dos basidiomicetos, e dentro do gênero *Sclerotium* as espécies podem ser diferenciadas por características das colônias como morfologia, tamanho dos escleródios, por diferença na coloração histoquímica, composição dos escleródios e por respostas de crescimento e temperatura (PUNJA, 1985; PUNJA; DAMIANI, 1996). As espécies pertencentes ao gênero *Sclerotium* apresentam estruturas assexuais como micélio branco presença de escleródios e ausência de esporos. Os esclerócios são estruturas macroscópicas, vegetativas, de forma esférica ou irregular, produzidas pelo enovelamento e solduras de hifas e providos de cortéx duro. Já as hifas são filamentos microscópicos com parede celular bem definida e quitinosa (MENEZES; OLIVEIRA, 1993). Curiosamente, este

fungo parece ter uma gama de hospedeiros limitada em comparação com o seu parente próximo *S. rolfsii* conhecido por infectar mais de 500 espécies de plantas (MUKHERJEE et al., 2015; PUNJA, 1985).

As características melhor detalhadas de *S. delphinii* foram descritas por Obee (1942), nas quais o fungo apresenta características do micélio com ramos que se ramificam livremente saindo de um septo e outras ocasiões saindo de algumas distâncias de um septo, e estes ramos são frequentemente menores em diâmetro que as hifas dos pais, isso é especialmente o caso das hifas que se fundem em pequenos fascículos para se transformar em escleródio. Outro tipo de micélio relatado consistia em células curtas semelhantes às observadas na região central esclerótica. Além dos tipos de micélios descritos acima, grampos de conexões eram encontrados com mais frequência em hifas maiores com diâmetro de 15 μ .

O mesmo autor escreve que em relação a formação dos escleródios que em apenas alguns dias após a inoculação do meio, a cultura já apresenta formação de corpos esclerociais, e que esses corpos característicos são produzidos quando uma dada hifa ou um grupo de hifas intimamente associadas sofrem anastomose ou quando são submetidos a condições favoráveis de temperatura ou nutrição. Macroscopicamente os escleródios de *S. delphinii* variam de um a oito milímetros, sendo o diâmetro médio um pouco acima de dois milímetros. Tipicamente são de forma globosa quando vistos da superfície dorsal, mas um tanto côncavo na superfície ventral, uma cicatriz frequentemente é produzida em forma de pedúnculo nesta superfície. Escleródios grandes têm um lado de baixo acidentalmente deformado de modo que se assemelha a um copo invertido. Já aqueles com menos de um milímetro geralmente têm forma globosa sem qualquer depressão na parte inferior. A cor dos escleródios maduros de *S. delphinii* variam de alaranjado a feno marrom. Outras cores observadas entre as linhagens que não eram típicas incluíam chocolate, castanho avermelhado, nogueira e sépia.

2.3 Características nutricionais de *Sclerotium* spp.

Muitos estudos detalhados foram feitos sobre os efeitos dos fatores sobre a formação de escleródios por fungos (VITAL et al, 1992; PERLMAN, 1948; TREVETHICK; COOKE, 1973). Para Wheler e Waller (1965), além dos fatores nutricionais, há também a acumulação no interior das hifas de uma substância ou substâncias que, quando atingem o nível crítico, estimula a produção de escleródios. Punja (1986), define essa influência quando há ausência

dos nutrientes na formação dos escleródios como *step-down*, isto é, privação súbita de nutrientes. De acordo com Perlman (1948), o fungo possui requisitos nutricionais relativamente simples para o crescimento. Kavanagh (1938), observou que a tiamina era um importante e essencial fator necessário no meio para o desenvolvimento do fungo *S. delphinii*. Além disso, Wang e Le Touneau (1971), relatam que compostos como pectina, rafinose, sacarose, maltose, lactose, D-manose, D-glicose, D-frutose, D-galaetose ou L-arabinose são importantes fontes de obtenção de nutrientes e apresentam um bom crescimento micelial junto com a formação de escleródios.

O carbono é o elemento mais importante para desenvolvimento dos microrganismos, seja em seu habitat, seja em cultura. É um dos elementos estruturais e funcionais necessários à síntese de enzimas, sendo fornecido preponderantemente pelos monossacarídeos, como glicose, frutose, galactose e manose. Já o nitrogênio é a parte essencial dos aminoácidos, que por sua vez compõem as proteínas. Todas as espécies de fungo crescem em meio com nitrogênio orgânico como asparagina, caseína e peptona (ZOUZA et al., 2016). Ainda de acordo com este autor enxofre e fósforo também são fundamentais para o desenvolvimento de microrganismos. O enxofre é utilizado em forma de sulfato e é necessário para a biossíntese dos aminoácidos cistina, caseína e metionina. Já o fósforo é o componente essencial da membrana, como também participa da síntese de ácidos nucléicos e ATP. Outros elementos como sódio, ferro, zinco, cobre, molibdênio, manganês, cobalto, cloro e etc., são necessários em quantidades pequenas, pois funcionam como cofatores ou para ativar enzimas nos meios de cultura Wheeler e Sharan (1965) observaram o comportamento da colônia quanto ao fornecimento de nitrogênio, e chegaram à conclusão que quando este for baixo em meio de cultura aumenta a produção de escleródios, os mesmos resultados obtidos por Punja (1986). Observações feitas por Griffin e Nair (1968), mostram que exposição de culturas em concentrações de CO₂ acima de 3,0 % o desenvolvimento do escleródio é inibido.

2.4 Meios de cultivo de *Sclerotium delphinii*

No cultivo de microrganismos, empregam-se meios de cultura contendo nutrientes e vitaminas necessários para seu crescimento e reprodução. Os nutrientes são fornecidos de forma a atender as exigências da espécie a ser cultivada, promovendo o crescimento e, ou, a esporulação satisfatória do organismo (ALFENAS et al., 2016)

Dentre os meios mais utilizados para a produção do inóculo destaca-se o BDA (Batata-

Dextrose-Ágar). Este é considerado como meio de cultura universal, pois suporta o crescimento da maioria dos fungos, sendo, por isso, usado mundialmente como meio de rotina em laboratórios de fitopatologia. Além disso, o fungo do gênero *Sclerotium* apresenta um bom desenvolvimento neste meio, entretanto, cada espécie possui necessidades nutricionais distintas (ALFENAS et al. 2016; PERLMAN, 1948).

O meio V8, embora utilizado especialmente para o crescimento e esporulação de várias espécies de fungo, para *S. rolfsii* e *S. coffeicola* este meio é ótimo em relação ao desenvolvimento colonial, diferente de *S. delphinii*, que se desenvolve melhor em BDA. Já em relação a produção esclerocial, o meio BDA é ótimo para as três espécies desse gênero (ALFENAS et al., 2006; PUNJA; DAMIANI, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar alguns aspectos morfológicos e fisiológicos de isolados de *Sclerotium delphinii* cultivados em diferentes meios de cultura.

3.2 Objetivos específicos

Descrever algumas características morfológicas das colônias dos isolados de *S. delphinii*, particularmente do micélio e dos escleródios.

Avaliar o crescimento micelial final e o progresso do crescimento micelial das colônias dos isolados de *S. delphinii*.

Avaliar a produção, dimensão, massa fresca e massa seca de escleródios maduros dos isolados de *S. delphinii*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.3 Origem e produção do inóculo de *Sclerotium delphinii*

A origem do inóculo utilizado neste experimento foi de amostras de pimenteiras-do-reino coletadas pelo acadêmico Leandro Jun Soki Shibutany e pelo professor Robinson Severo em uma lavoura comercial familiar da comunidade de Cipoal localizada na cidade de Santarém, região Oeste do Pará. Estas amostras foram encaminhadas para o Laboratório de fitopatologia do Instituto de Biodiversidade e Florestas – IBEF, da Universidade Federal do Oeste do Pará, UFOPA, para a caracterização de sintomas e sinais, assim como realizar os isolamentos para a obtenção das culturas puras dos isolados.

Foram utilizados cinco isolados para a produção de inóculo do patógeno: SMT 7, SMT 13, SMT 19, SMT 20 e SMT 32. Destes isolados foram retirados discos de micélio oriundos de colônias jovens de 9 mm de diâmetro, os quais foram transferidos para placas de petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), que foram mantidas encima de bancadas por sete dias a temperatura de 30°C, com 24 horas de luz constante.

4.4 Confeção dos meios de cultura

Para a confecção do meio V8-ágar, foram utilizados 200 mL do suco V8, 3 g de CaCO₃, 20 g de ágar e 1.000 mL de água destilada. A pesagem da quantidade certa do carbonato de cálcio e do ágar foi realizada com o auxílio de uma balança de precisão da marca Weblaborsp. Logo após a pesagem dos reagentes foi feita a fusão do ágar que foi misturado junto aos demais componentes completando o volume para 1000 mL com água destilada. Por fim, os meios foram autoclavados a 121°C por 20 minutos (DIENER, 1952; PATRICK, 1995, apud ALFENAS; MAFIA, 2016)

Para o meio de malte-ágar, foram usadas as quantidades de 20g de extrato de malte, 20g de ágar e 1000 mL de água destilada. Para seu preparo, a fusão do ágar em 500 mL de água foi feita em um Becker de 1000 mL e logo em seguida completado o volume para 1000 mL com água e autoclavados a 121°C por 20 minutos (TUIITE, 1969, apud ALFENAS; MAFIA, 2016)

Para o meio batata-dextrose-ágar foram utilizadas 200g de extrato de babata, 20 g de dextrose, 20 g de ágar e 1000 ml de água destilada. Batatas descascadas e cortadas em cubinhos foram cozidas em 500 mL de água no micro-ondas por 10 minutos e, em seguida filtrou-se o

caldo em gaze. Foi feita a fusão do ágar com a quantidade de dextrose em 500 mL de água, adicionando o caldo (decoto) completando-se o caldo o volume para 1000 mL com água destilada, e por fim, autoclavando o meio a 121°C por 20 minutos (ALFENAS; MAFIA 2016).

Inicialmente, para o preparo do meio aveia-ágar, foi utilizado um liquidificador para misturar 75 g de aveia em flocos em 600 mL de água durante cinco minutos. Em seguida aqueceu-se a mistura a 45-55°C e depois foi feita a adição de 20 g de ágar previamente fundido em 400 mL de água sendo o meio esterilizado por autoclavagem pela mesma temperatura que os demais. (GOODINHO; LUCAS, 1959, apud adaptado MENEZES ;SILVA-HANLIN, 1997).

As medidas para o meio milho-ágar foram seguidas conforme adaptado de Menezes e Silva-Hanlin (1997), onde se utilizou 75 g de fubá, 20 g de ágar e 1000 mL de água destilada. O milho foi pesado com o auxílio de uma balança de precisão da marca weblaborsp, em seguida fundido em 500 mL de água destilada e aquecido com auxílio de banho maria da marca NOVATECNICA a 50°C durante 10 minutos. Após isso, foi feita a fusão do ágar em 500 mL de água destilada e misturado junto aos 500 mL de fubá.

4.5 Semeadura do inóculo de *Sclerotium delphinii* em meios de cultura

Para a semeadura do inóculo foram utilizadas 200 placas de acrílico de 90 cm de diâmetro. Cada placa recebeu de seu respectivo substrato 20 mL de meio. Esta medição foi feita utilizando pipetas de 20 mL acompanhado de um pipetador pipette da marca Pump. Para que os substratos não solidificassem durante o processo de vertição, fez-se necessário o uso de banho maria a 90°C durante todo o processo.

Foram retirados dos cinco isolados para a produção de inóculo, discos de micélio oriundos de colônias jovens de 9 mm de diâmetro e em seguida repicados para as placas contendo os diferentes meios e, posteriormente, incubados encima das bancas do laboratório a uma temperatura de 30°C, com luminosidade constante por sete dias.

4.6 Medição do crescimento micelial em meios de cultura

Foi observado o crescimento do micélio, medindo-se o diâmetro da colônia de 12 em 12 horas (as sete horas da manhã e as 19 horas da noite), com o auxílio de um paquímetro digital da marca MARBERG, tomando-se duas medições em sentidos diametralmente opostos. As

leituras foram iniciadas 24 h após a instalação do experimento, até a colonização total das superfícies de todas as placas. As primeiras leituras foram realizadas no dia 31 de março de 2019 e a última foi no dia 11 de abril de 2019.

4.7 Descrição morfológica dos isolados de *Sclerotium delphini*

Para a descrição morfológica dos isolados foram analisados duas variáveis conforme Punja e Damiani (1996): micélio e escleródios. Para o micélio, foram determinadas as características conforme a cor e textura das colônias e, para os escleródios, o diâmetro e peso durante sua formação inicial (quando imaturos) e final (maduros). Foram considerados imaturos escleródios que possuíam coloração esbranquiçada, e maduros aqueles de coloração mais escura.

4.8 Produção de escleródios imaturos e maduros de *Sclerotium delphini*

Após 11 dias de incubação, iniciaram-se as contagens dos escleródios imaturos e maduros. Essa contagem foi realizada em intervalos de 24 horas sendo finalizada no 21º dia de incubação.

4.9 Massa fresca e seca de escleródios maduros de *Sclerotium delphini*

A massa fresca e seca dos escleródios foi feita somente para os escleródios maduros, pois na literatura é a massa dos escleródios maduros que é mais realizada a quantificação.

A massa fresca dos escleródios foi quantificada ao final dos 21 dias de incubação, e então foi determinada que seriam retirados ao acaso 20 escleródios por placa. Após escolhidos os escleródios foi feita a pesagem do material utilizando uma balança de precisão da marca Weblaborsp.

A mesma quantidade de escleródios foi determinada para a massa seca. Foi utilizada a metodologia de Punja e Damiani (1996) onde, após selecionados os escleródios, os mesmos foram submetidos a uma estufa a 45°C por dois dias. Após secos, massa dos escleródios foi quantificada através da pesagem com auxílio de uma balança de precisão da mesma marca utilizada para a pesagem da massa fresca.

5.0 Diâmetro dos escleródios de *Sclerotium delphinii*

Foi realizada a medição do diâmetro apenas das placas que possuíam a quantidade de 0 a 20 escleródios. Após a secagem dos mesmos escleródios utilizados para a massa seca e fresca, foi feita a medição do diâmetro com o auxílio de um paquímetro digital da marca MARBERG.

5.1 Delineamento experimental

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado que foi feito utilizando o software... Considerou-se cinco meios de cultura, para cinco isolados, sendo que cada isolado era composto por oito repetições cada.

5.2 Análise estatística

Inicialmente, as variáveis foram sistematizadas em planilhas do programa Excel 2013. Logo após, estas foram submetidas aos testes de Shapiro Wilk, Kolmogorov-Smirnov e Anderson Darling, para avaliar sua distribuição. Como as variáveis não apresentaram distribuição normal, reportaram-se análises estatísticas descritivas paramétricas (média aritmética e variância) com fins de comparação. Os cálculos foram realizados com o programa SPSS Statistics versão 9.0 (IBM SPSS, 2019).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Descrição morfológica dos isolados de *Sclerotium delphinii*

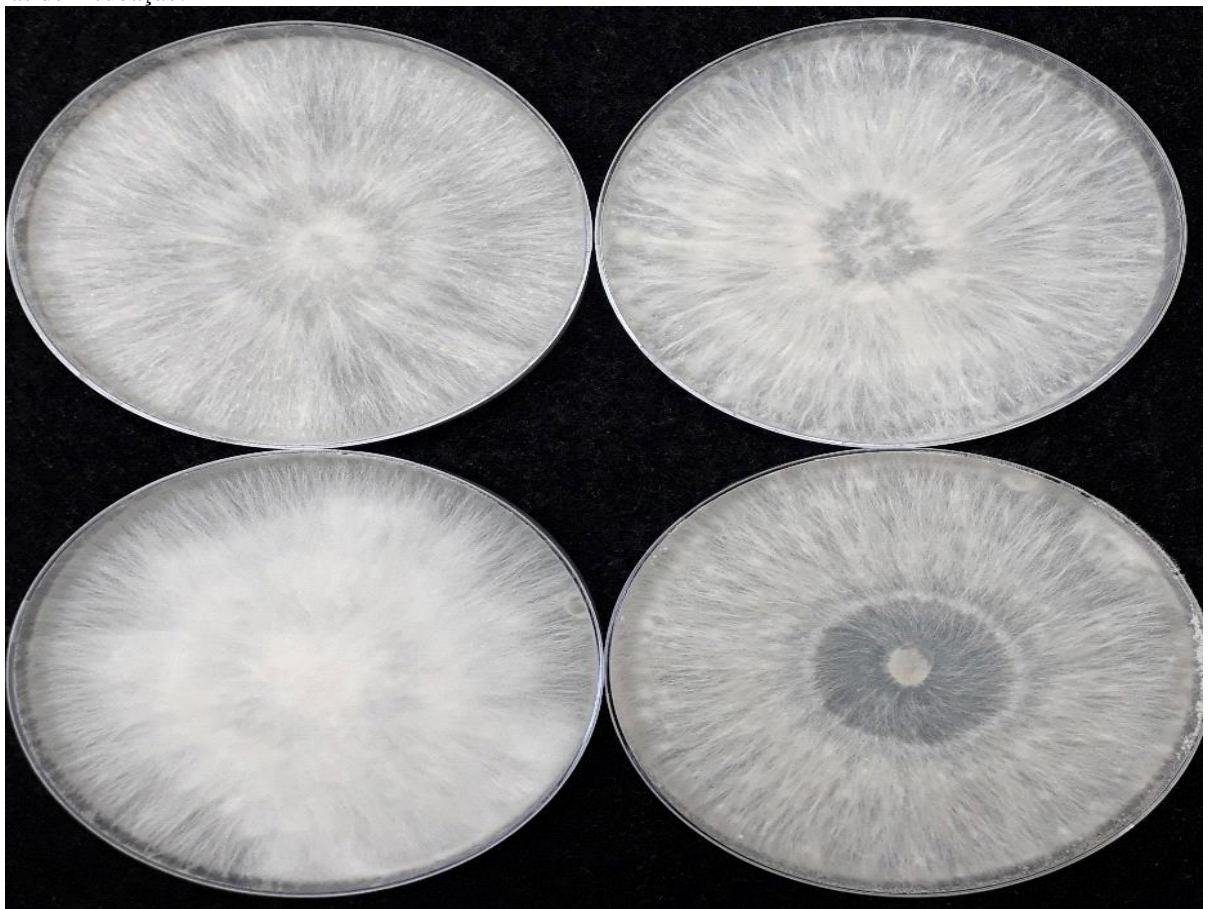
5.1.1 Meio de cultura de batata-dextrose-ágar

O micélio rizomatoso de cor branca e textura não densa com aspecto fino e rasteiro foram as características expressadas por todos os isolados (FIGURA 1). Obee (1942) descreveu as características do micélio para *S. delphinii*, quando cultivado em meio BDA, com a mesma morfologia dos isolados apresentados nesse experimento, demonstrando que há um padrão para a formação micelial quando o fungo é submetido a este meio. Estes isolados não apresentaram formação de cordão micelial e nem sofreram alteração na cor do micélio até o final do

experimento.

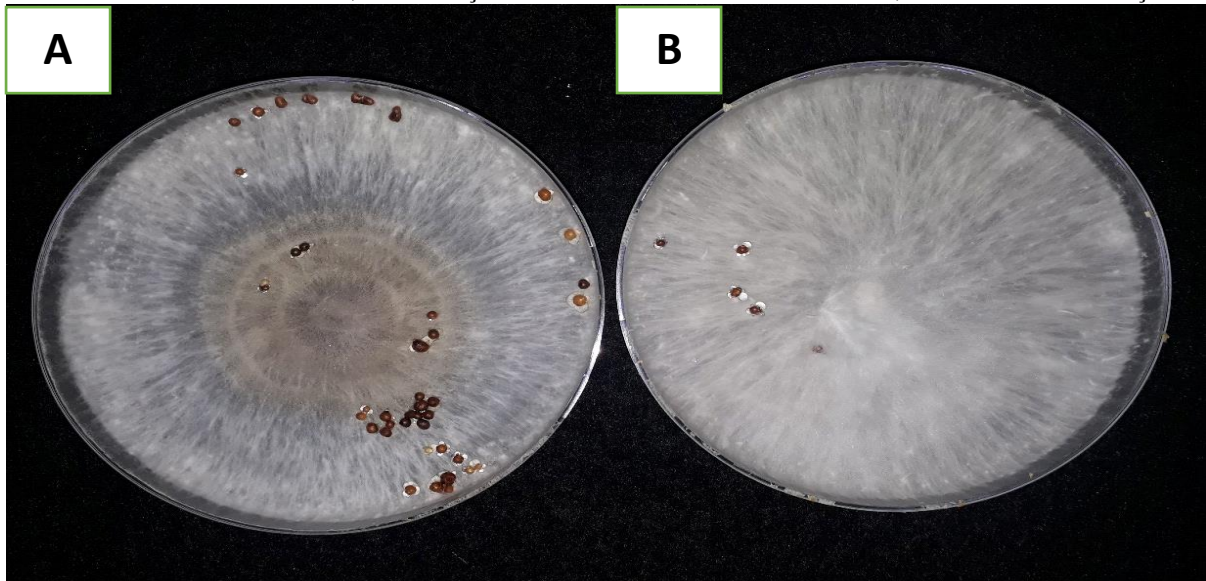
Dos cinco isolados produzidos em meio BDA, o SMT 32 foi o primeiro a produzir enovelamentos de formato globosos, de cor castanho amarelada e de tamanhos pequenos após onze dias de incubação (FIGURA 2A). Quando maduros a coloração dos esclerócios variou entre as tonalidades de caramelo e marrom avermelhado, mesmas características observadas por Punja e Damiani (1996) (FIGURA 2B).

Figura 1 – Micélio de textura densa, fina e rasteiro de coloração esbranquiçada das colônias dois isolados de *S. delphinii* cultivados em meio de BDA, sob condições de luz branca fluorescente constante, aos onze dias de incubação.



Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

Figura 2 – (A) Escleródios imaturos de cor castanho amarelada de *S. delphinii* cultivados em meio de BDA, sob condições de luz branca fluorescente constante, aos 21 dias de incubação. (B) Escleródios maduros de coloração marrom avermelhada meio BDA, sob condições de luz branca fluorescente constante, aos 21 dias de incubação.



Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

5.1.2 Meio de cultura de extrato de malte

Foi observado que maior parte dos isolados cultivados no meio malte-água, apresentavam formação rizomatososa, cor branca, textura do micélio densa/filamentoso e desenvolvimento rasteiro (FIGURA 3). Com relação a outros autores descrevendo as características morfológicas do fungo *S. delphinii* em meio de cultura mate-água, não há na literatura disponível e nenhuma referência em relação a descrição da mesma, entretanto conforme Vital et al (1992), que estudaram o *Sclerotium coffeicola* em meio de cultura malte-água, essas colônias apresentaram aspecto cultural de micélio branco e submerso, que são características parecidas com os resultados obtidos neste experimento, demonstrando que pode haver uma relação do fungo com o meio de cultura malte-água que produza as mesmas definições para as espécies deste gênero. As colônias produzidas neste meio não formarão cordão micelial nem sofrerão alteração na cor do micélio até o final do experimento.

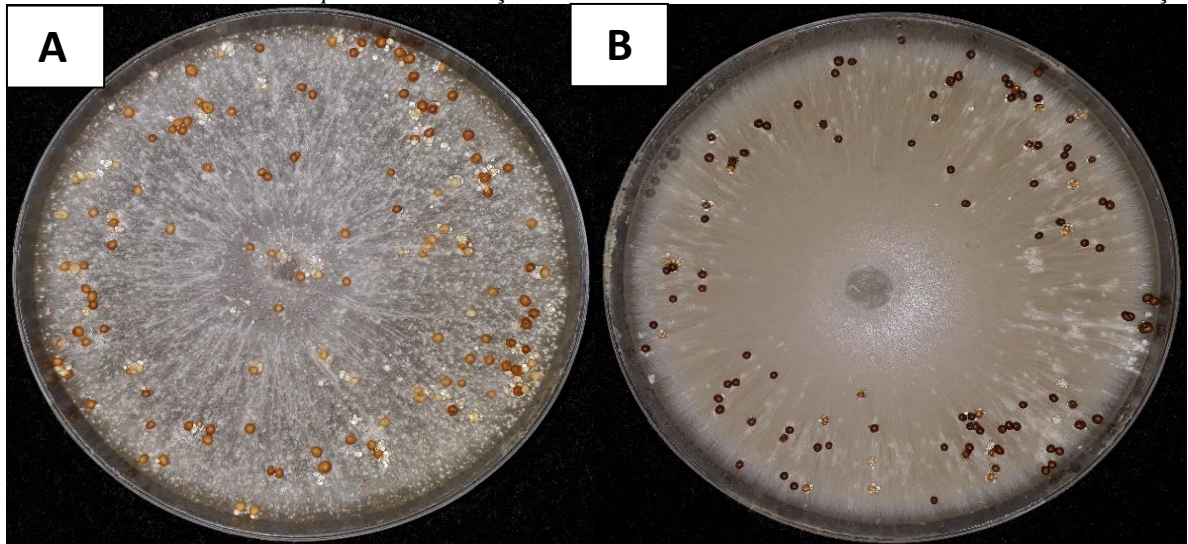
O aparecimento de envelamentos se iniciou decorrido nove dias de incubação apenas para os isolados SMT 32 e SMT 19. Esses envelamentos apresentavam cor que variava de amarelo claro a creme e seu formato era globoso, de tamanho pequeno (FIGURA 2A) e que quando maduros os escleródios expressaram cor marrom escuro (FIGURA 2B).

Figura 3 – Micélio rizomatoso de cor branca e textura densa/filamentosa das colônias de *S. delphinii* cultivados em, meio malte-ágar, sob condições de luz branca fluorescente constante, aos onze dias de incubação.



Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

Figura 4 – (A) formação de escleródios imaturos de coloração amarelo claro de *S. delphinii* dispersa por toda área da placa sob condições de luz branca fluorescente constante aos nove dias de incubação e (B) Escleródios maduros de cor marrom escuro de *S. delphinii* sob condições de luz branca fluorescente constante aos 21 dias de incubação.



Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

5.1.3 Meio de cultura V8-ágar

O meio de cultura V8 foi o que mais apresentou variação na formação do micélio durante o período de incubação. Os isolados apresentaram quatro diferentes tipos de micélio: filamentosos, com formação mais dispersa, de textura não densa e textura mais densa (FIGURA 5). A cor do micélio permaneceu branca para todos os cinco isolados durante todo o processo. Foi observado que em algumas placas iniciou-se a formação de cordão micelial (FIGURA 5), entretanto, após alguns dias, essa formação se desfez em meio ao micélio.

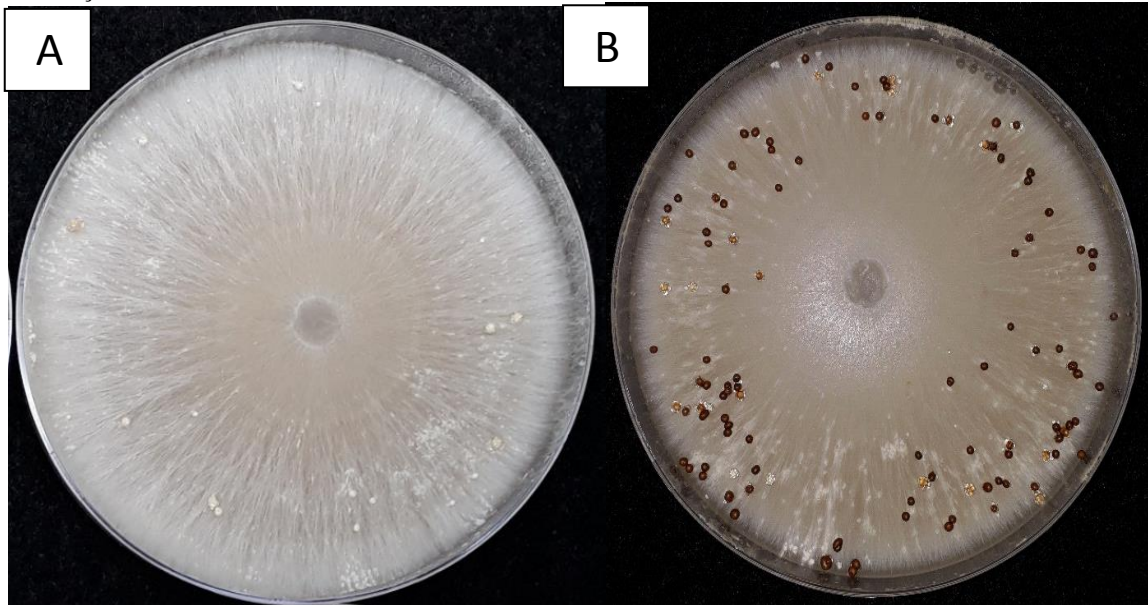
Na sua fase imatura os enovelamentos apresentaram diferentes tipos de cores. Alguns escleródios expressaram uma coloração esbranquiçada enquanto que outros amarelo claro. Desde sua fase imatura até madura os escleródios desenvolveram formato esférico e tamanhos pequenos que cresceram de forma dispersa por toda a placa (FIGURA 2 A). Punja e Damiani (1996) quando avaliaram a morfologia do fungo *S. delphinii* em meio de cultura V8-ágar, descreveram os escleródios formados neste substrato com formato irregular e formação dos escleródios na periferia da placa. A possível explicação para essa diferenciação na formação esclerócica é a existência de variabilidade dos isolados. Foram observadas nos esclerócios maduros as colorações marrom avermelhada e castanho escuro (FIGURA 2 B).

Figura 5- Quatro diferentes tipos de micélio: filamentosos, com formação mais dispersa, de textura não densa e textura mais densa das colônias de *S. delphinii* cultivados em, meio V8-ágar, sob condições de luz branca fluorescente constante, aos onze dias de incubação



Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

Figura 6 – (A) Escleródios de cor esbranquiça e amarelo claro imaturos de *S. delphinii* cultivados em meio de cultura V8-ágar, sob condições de luz branca fluorescente constante, aos 8 dias de incubação e (B) Escleródios marrom avermelhados e castanho escuro maduros de *S. delphinii* em meio de cultura V8-ágar aos 21 dias de incubação.



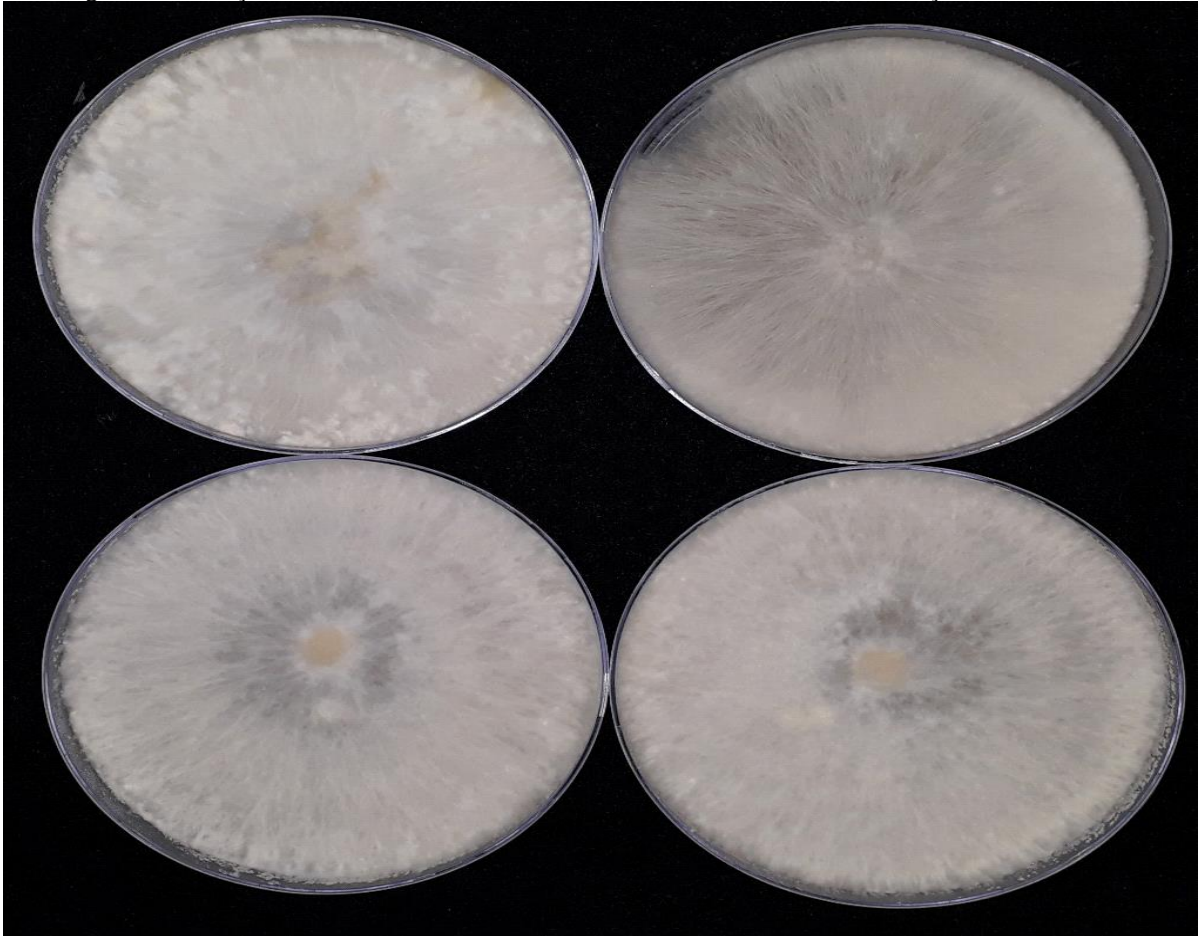
Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

5.1.4 Meio de cultura de milho-ágar

Dentre todos os meios de cultura avaliados nesse trabalho, o meio milho-ágar foi o único que não apresentou aspecto rizomatoso aos 21 dias de incubação. A textura e cor do micélio nos primeiros dias de incubação foi densa, rastejante e de cor branca (FIGURA 7). Foi observada no final do período de incubação alteração na textura para mais flocosa, havendo também variação na coloração do micélio de branco para a cor creme (FIGURA 8). Essas mesmas características se confirmam para os resultados obtidos por Obee (1942) em relação a textura do micélio de isolados de *S. delphinii* cultivados me meio milho-ágar.

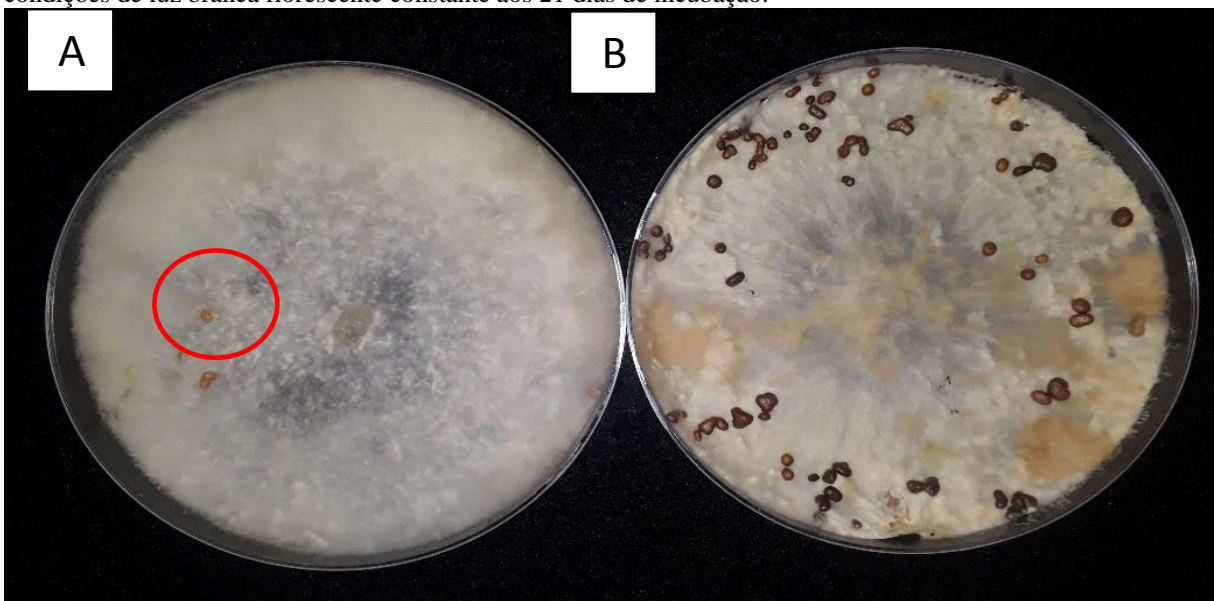
Aos 10 dias de incubação, o primeiro isolado a formar enovelamentos foi o SMT 20, seguido de SMT 19 e por fim de SMT 7. Esses enovelamentos possuíam formato achatado e irregular de coloração amarelada (FIGURA 8A). O amadurecimento dos escleródios se iniciou após 14 dias de incubação e quando maduros a cor dos escleródios apresentou a coloração marrom escuro (FIGURA 8 B).

Figura 7 – micélio de textura densa, rastejante e de cor branca das colônias de *S. delphinii*, cultivados em meio milho-ágar, sob condições de luz branca fluorescente constante, aos onze dias de incubação.



Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

Figura 8 – (A) Esclerócios imaturos de formato irregular e coloração amarelada de *S. delphinii* cultivados em meio de cultura milho-ágar em condições de luminosidade fluorescente branca constante, aos onze dias de incubação e (B) Esclerócios maduros de coloração marrom escuro de *S. delphinii* em meio de cultura milho-ágar sob condições de luz branca fluorescente constante aos 21 dias de incubação.



Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

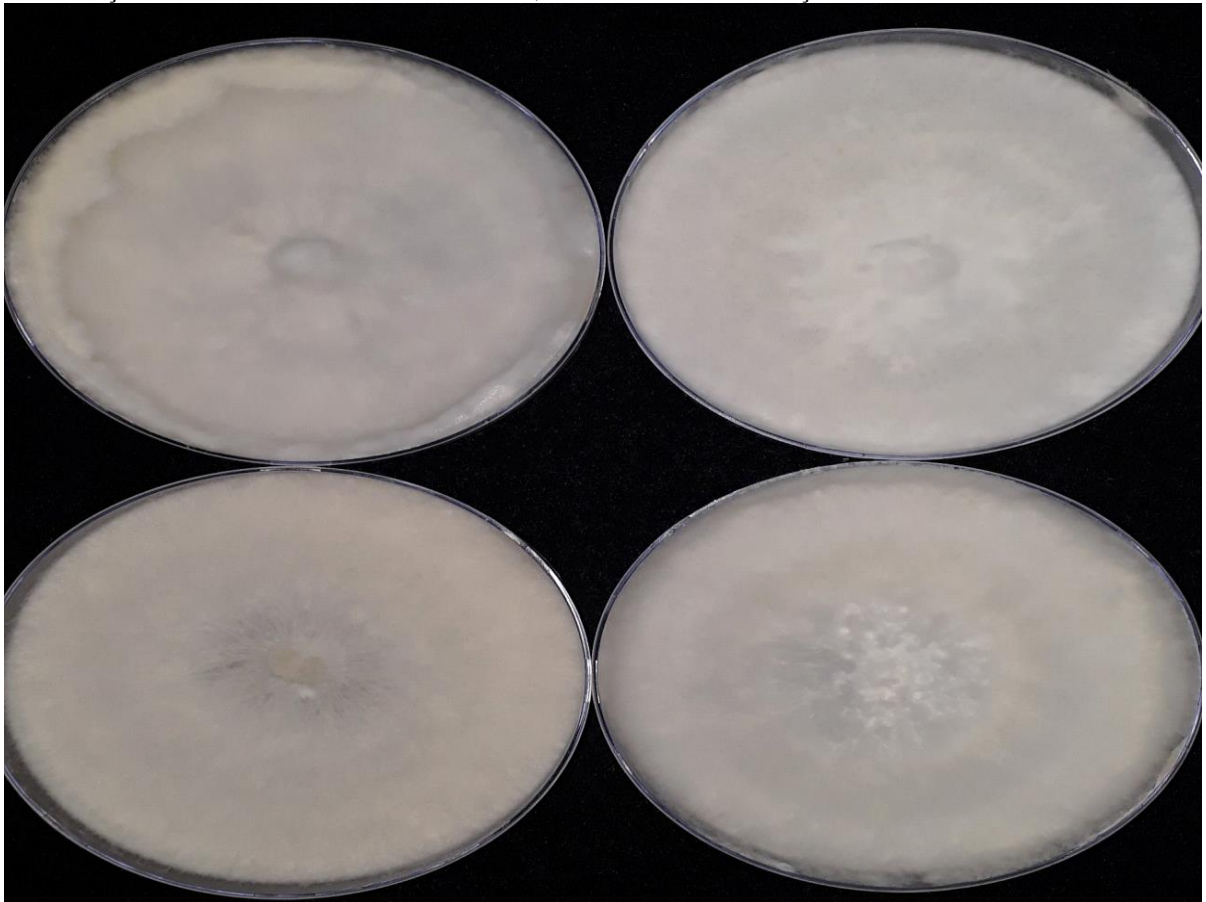
5.1.5 Meio de cultura aveia-ágar

Dentre todos os meios, este foi o único que proporcionou para todos os isolados, o desenvolvimento de um tipo de micélio com textura cotonosa. Durante os primeiros dias de incubação o micélio apresentou cor branca, entretanto, no final do experimento a cor do micélio dos isolados mudou para creme (FIGURA 10A). Foi possível observar o desenvolvimento micelial ao longo da parte de cima da placa também.

Outra característica observada nos isolados crescidos neste meio de cultura foi em relação ao tamanho dos escleródios, mostrando-se maiores quando comparados aos produzidos nos meios V8, BDA, Malte e Milho. Essas estruturas apresentaram formato achatado e desuniformes (FIGURA 10 B). Com relação a essa tipo de formação esclerocial Wheeler e Waller (1965), explicam que isso acontece por conta do acúmulo de alguma substância dentro da hifa e que esta aglomeração é formada quando algum nível crítico é alcançado.

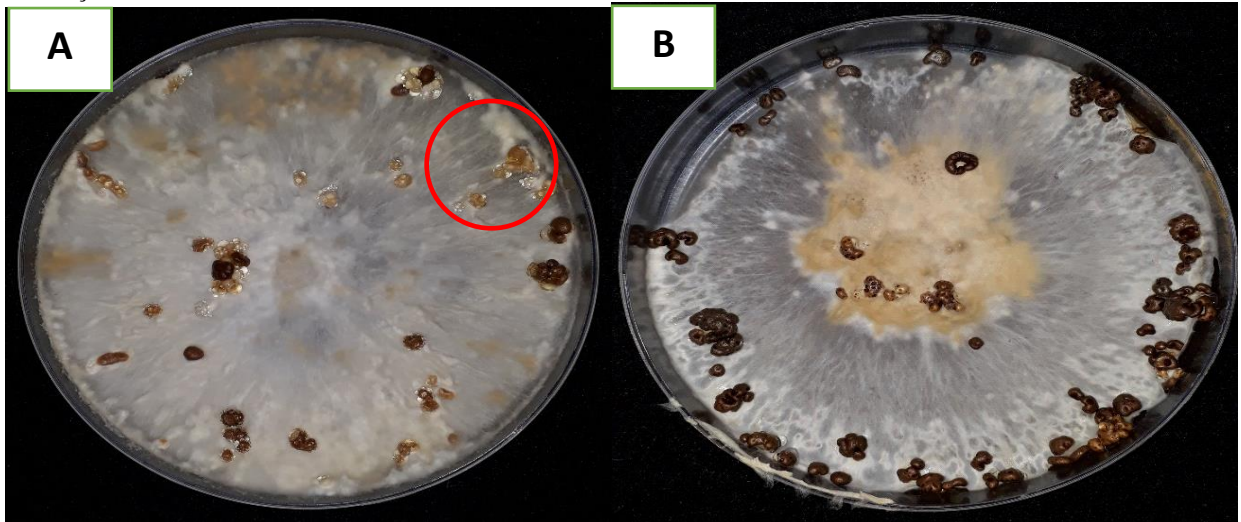
Os escleródios imaturos apresentaram coloração creme e amarelo durante o período de incubação (FIGURA 10A), e quando maduros sua cor se alterou de castanho claro a castanho escuro (FIGURA 10B).

Figura 9 – Micélio de textura cotonosa e cor branca das colônias de *S. delphinii*, cultivados em meio aveia-ágar, sob condições de luz branca fluorescente constante, aos onze dias de incubação.



Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

Figura 10 – (A) Alteração da cor micelial do isolado SMT 20 e escleródios imaturos de coloração creme e amarelo com formato achatado e desuniformes (B) Escleródios maduros de coloração castanho escuro de *S. delphinii* cultivados em meio aveia-ágar sob condições de luminosidade branca fluorescente constante, aos 21 dias de incubação.



Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

5.2 Crescimento micelial do isolados de *Sclerotium delphinii*

Tabela 1 – Crescimento micelial final das colônias (mm) de cinco isolados de *Sclerotium delphinii* cultivados em diferentes meios de cultura

Meios de Cultura	Estatística	SMT 7	SMT 13	SMT 19	SMT 20	SMT 32
BDA	\bar{X}	75,01	37,98	90,00	70,38	45,07
	σ^2	46,28	8,72	0	7,21	36,41
E. malte-ágar	\bar{X}	71,62	36,56	72,14	64,15	42,16
	σ^2	3,96	15,84	16,02	9,95	8,55
V8-ágar	\bar{X}	62,12	35,52	64,43	56,76	28,76
	σ^2	17,39	16,27	15,86	52,92	60,91
Milho-ágar	\bar{X}	62,72	28,73	66,28	70,90	29,76
	σ^2	3,04	4,83	4,49	16,58	4,91
Aveia-ágar	\bar{X}	67,70	29,70	63,97	54,46	31,49
	σ^2	4,28	12,20	1,96	24,60	4,99

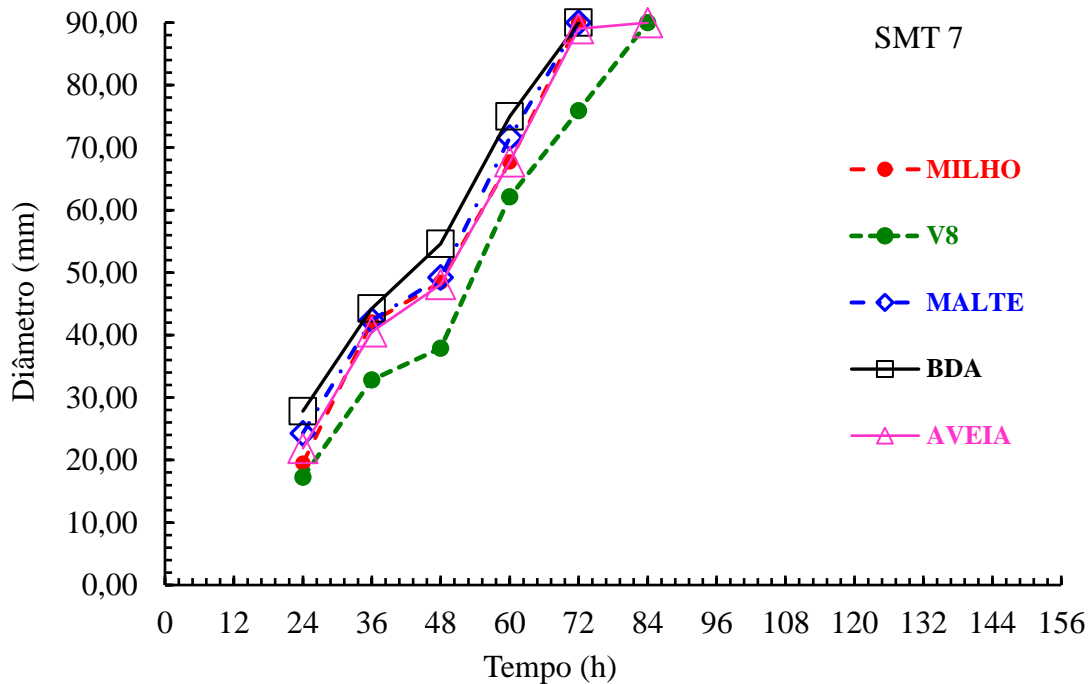
BDA = batata-dextrose-ágar; E. malte-ágar = extrato de malte-ágar.

Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

Generalizando-se, o crescimento micelial final das colônias (mm) dos isolados de *Sclerotium delphinii* foi maior em meio de BDA, independentemente do isolado. Resultados semelhantes foram obtidos por Punja e Damiane (1996) quando avaliaram o crescimento de *S. rolfsii*, *S. coffeicola* e *S. delphinni*. Além do meio de BDA, o meio milho-ágar proporcionou maior crescimento micelial para o isolado SMT 20. Os menores crescimentos miceliais das colônias de *S. delphinii* foram obtidos com os meios de V8-ágar, milho-ágar e aveia-ágar (TABELA 1).

Via de regra, o progresso micelial das colônias (mm/12h) dos isolados de *S. delphinii* foi maior em meio BDA. Neste sentido, o tempo levado para as colônias atingirem as bordas das placas de Petri foram 72 h, 120 h, 60h, 72 h e 96 h, correspondentemente para os isolados SMT 7, SMT 13, SMT 19, SMT 20 e SMT 32 (FIGURAS 1,2,3, 4 e 5).

Figura 11 – Progresso do crescimento micelial das colônias do isolado SMT 7 de *Sclerotium delphinii* cultivado em diferentes meios de cultura.

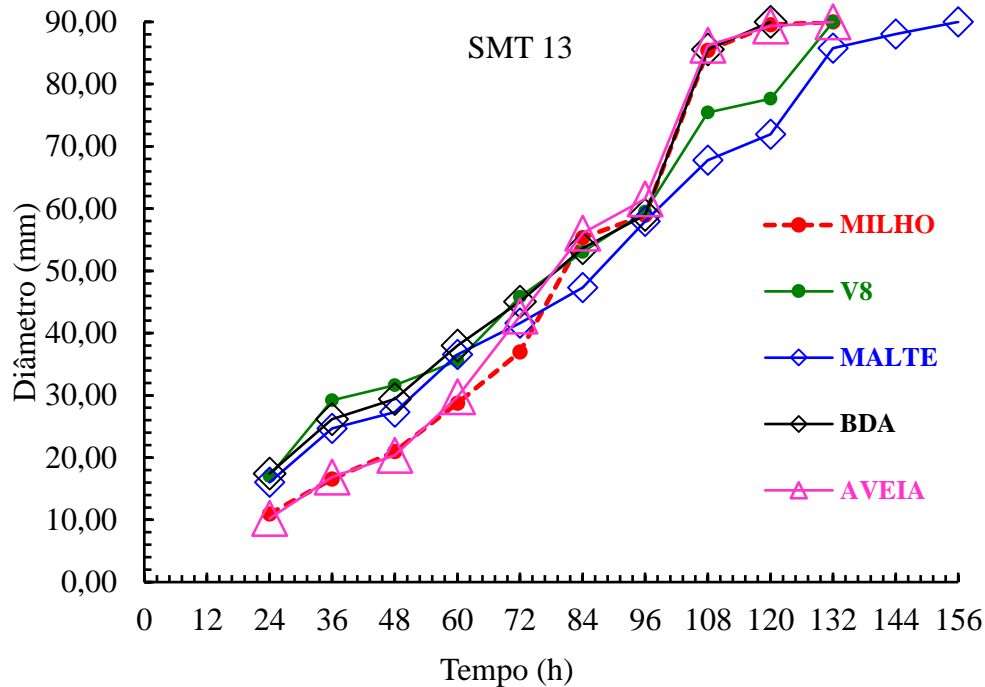


Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

Dentre os cinco isolados, o SMT 7 foi o único que teve um maior desenvolvimento micelial para três meios de cultura num período menor de tempo que os outros isolados. Esses meios foram BDA, malte-ágar e milho-ágar que em 72 horas, menos de 3 dias, atingiram os 90 mm da placa. Saccas (1957) obteve os mesmos resultados para o fungo *Sclerotium coffeicola* cultivados em meios a base de malte e BDA, demonstrando que quando submetido a estes tipo específico de nutrientes, os fungos do gênero *Sclerotium* apresentam rapidez no desenvolvimento da colônia. Os meios V8 e aveia-ágar apesar de não terem crescido no mesmo período de tempo que os outros meios, levaram 12 horas para alcançar o mesmo resultado dos substratos BDA, malte-ágar e milho-ágar. (FIGURA 11). Diante disso, é possível afirmar que, apesar de cada meio ter demonstrado diferentes desempenhos para o isolado SMT 7, o pouco intervalo de tempo entre os meios que levaram 72 horas para atingir a área total e os que levaram 84 demonstra que para este isolado específico os substratos pouco interferiram no progresso em

relação do tempo (FIGURA 11).

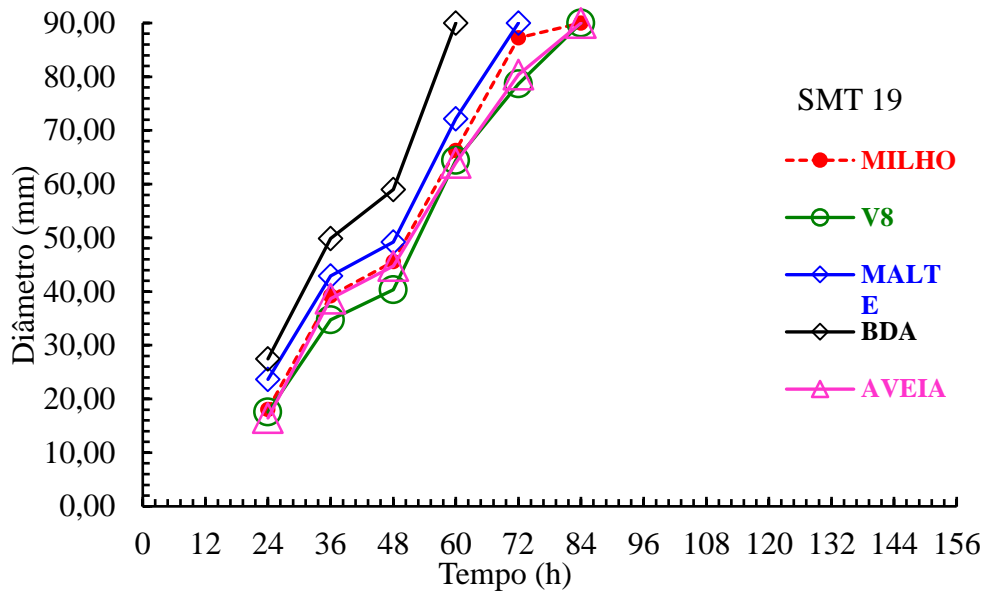
Figura 12 – Progresso do crescimento micelial das colônias do isolado SMT 13 de *Sclerotium delphinii* cultivado em diferentes meios de cultura.



Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

Dentre todos os isolados, o SMT 13 foi o que teve seu progresso micelial mais longo em comparação ao SMT 7, SMT 19, SMT 20 e SMT 32. Diante disso, três diferentes grupos foram observados em relação ao comportamento nos cinco diferentes meios. O primeiro grupo formado pelos meios BDA e milho-ágar foi o que melhor se sobressaiu no crescimento das colônias em comparação aos outros dois grupos. Durante a metade do quinto dia de leituras o micélio do fungo já havia crescido sobre toda a área da placa, totalizando aproximadamente 120 horas para atingir esse resultado desde o início da instalação do experimento. Já o grupo dois formado pelos meios de cultura V8 e aveia-ágar foi o grupo intermediário que em 132 horas o micélio alcançou os 90 mm de diâmetro da placa. Por fim, o grupo três representado pelo meio malte-ágar demorou mais tempo que os demais meios para atingir a área total da placa, que foi de 156 horas. Diferente do isolado SMT 7, que teve um bom desenvolvimento micelial no meio malte-ágar, o SMT 13 quando submetido a este tipo de nutriente demonstrou lento crescimento das colônias, o que levanta a hipótese que a exigência nutricional varia de isolado para isolado (FIGURA 12).

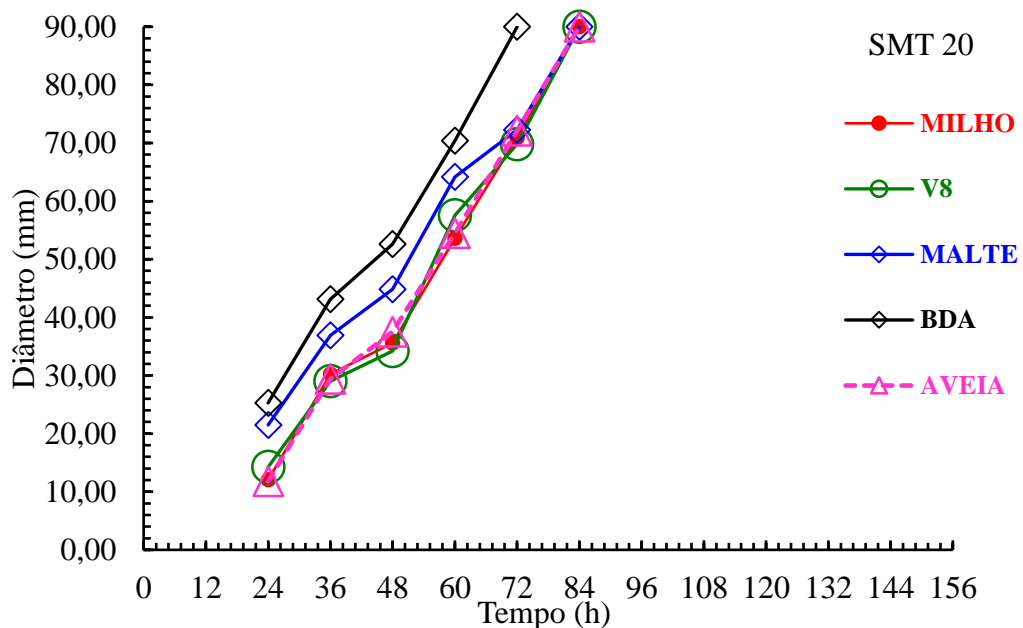
Figura 13 – Progresso do crescimento micelial das colônias do isolado SMT 19 de *Sclerotium delphinii* cultivado em diferentes meios de cultura.



Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

O meio BDA para o isolado SMT 19 foi o melhor para o crescimento micelial se comparado aos outros meios, levando apenas 60 horas para atingir toda a placa, seguido do meio malte-ágar que levou 72 e por último os meios milho-ágar, aveia-ágar e V8-ágar que tiveram o desenvolvimento lentos num período de 84 horas (FIGURA 13).

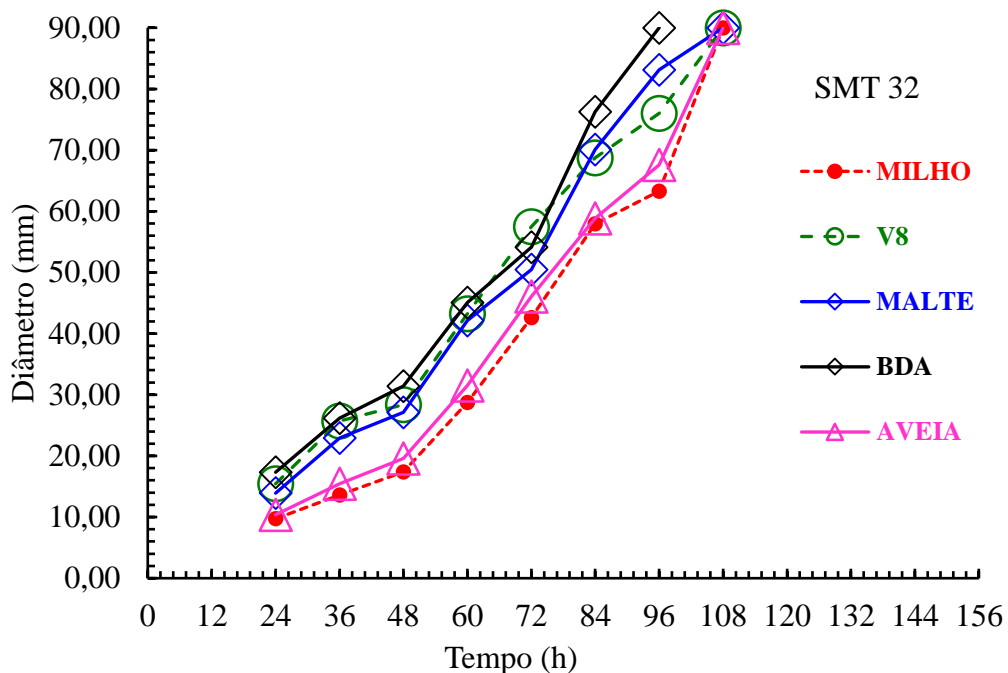
Figura 14 – Progresso do crescimento micelial das colônias do isolado SMT 20 de *Sclerotium delphinii* cultivado em diferentes meios de cultura.



Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

Assim como para os outros isolados, o meio BDA também foi o melhor para o crescimento micelial do isolado SMT 20, levando o período de 72 horas para alcançar a área total da placa. Os meios milho-ágar, V8-ágar, malte-ágar e aveia-ágar levam 84 horas, o mesmo tempo, para atingir os 90 mm da placa (FIGURA 14).

Figura 15 – Progresso do crescimento micelial das colônias do isolado SMT 32 de *Sclerotium delphinii* cultivado em diferentes meios de cultura.



Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

O comportamento do isolado SMT 32 para os meios milho-ágar, V8, malte-ágar, BDA e aveia-ágar pode ser observado através da formação de dois grupos que responderam de formas diferentes quando submetidos a estes substratos. O primeiro grupo é representado pelo meio de cultura BDA, que assim como para os outros isolados, também foi o melhor para o crescimento micelial do isolado SMT 32 que em 96 horas atingiu os 90 mm de diâmetro da placa (FIGURA 15). O segundo grupo formado pelos meios malte-ágar, V8, milho-ágar e aveia-ágar apesar de terem tido um desenvolvimento mais lento, tiveram o crescimento final dos 90 mm de diâmetro no período de 108 horas.

5.3 Produção de massa fresca e seca de escleródios maduros de *Sclerotium delphinii*

Usualmente, a produção de escleródios imaturos dos isolados de *S. delphinii* foi maior em meio V8-ágar. Uma característica observada neste meio, foi a produção de escleródios comparada aos demais meios, entretanto, Punja e Damiani (1996) quando avaliaram a produção esclerocial de isolados de *S. delphinii* cultivados em meio de cultura V8, demonstraram que este substrato não estimulou uma boa produção de escleródios se comparado ao meio BDA. Além do meio V8-ágar, os meios de BDA e milho-ágar proporcionaram maior crescimento micelial para o isolado SMT 20 e o meio de extrato de malte para o isolado SMT 32. Generalizando-se, as menores produções de escleródios imaturos das colônias de isolados de *S. delphinii* foram obtidas com o meio de milho-ágar. Outrossim, para esta variável, os meios de aveia-ágar para o isolado SMT 7 e o de extrato de malte para o isolado, foram os que propiciaram as menores produções de escleródios imaturos. Os meios de cultura não se diferenciaram quanto a produção de escleródios imaturos (TABELA 2).

Tabela 2 - Produção de escleródios imaturos de cinco isolados de *Sclerotium delphinii* cultivados em diferentes meios de cultura

Meios de Cultura	Estatística	SMT 7	SMT 13	SMT 19	SMT 20	SMT 32
BDA	\bar{X}	1,05	0,24	2,28	3,45	5,42
	σ^2	0,64	0,08	1,69	24,07	15,47
E. malte-ágar	\bar{X}	0,41	0,02	5,39	0,03	14,42
	σ^2	0,18	0	27,57	0,01	80,33
V8-ágar	\bar{X}	8,12	2,64	7,28	5,95	18,21
	σ^2	14,38	25,22	7,30	194,34	222,21
Milho-ágar	\bar{X}	0,08	0	0,15	1,80	0,10
	σ^2	0,06	0	0,07	1,51	0,09
Aveia-ágar	\bar{X}	0,13	0,8	0,26	1,13	14,42
	σ^2	0,04	0,03	0,10	3,51	7,81

BDA = batata-dextrose-ágar; E. malte-ágar = extrato de malte-ágar.

Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

Na maior parte dos casos, a produção de escleródios maduros dos isolados de *S. delphinii* foi maior em meio V8-ágar. Esses resultados podem ser comparados aos obtidos por Punja e Damiani (1996), que demonstraram que quando o fungo *S. delphinii* é submetido a este meio produz uma quantidade boa de escleródios.

O meio de cultura milho-ágar foi o meio que menos favoreceu o fungo *S. delphinii* a produzir uma quantidade maior de escleródios. Para os fungos *S. rolfsii* e *S. coffeicola*, o meio de cultura milho-ágar é considerado uma ótima fonte de nutrientes para o desenvolvimento esclerocial. Serra e Silva (2005), em seu estudo realizado com *S. rolfsii*, demonstrou que quando

em meio de cultura milho-ágar e sob condição de luz contínua, o fungo apresenta um ótimo desempenho na produção de escleródios. Além disso, Vital et al. (1992), também acharam os mesmos resultados para o fungo *S. coffeicola*, o que mostra que dentre os fungos deste gênero, o fungo *S. delphinii* é o único que não possui a mesma resposta e necessidade nutricional quando submetido a este meio de cultura

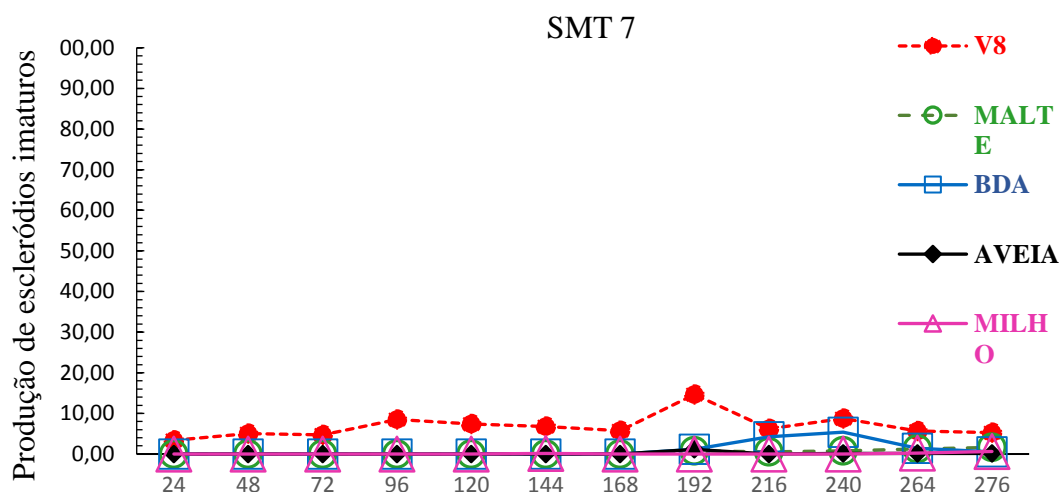
De forma geral, as menores produções de escleródios imaturos das colônias de isolados de *S. delphinii* foram obtidas com o meio de milho-ágar e aveia-ágar. Similarmente, o meio de extrato de malte foi o que oportunizou a menor produção de escleródio imaturo para o isolado SMT 20 (TABELA 3).

Tabela 3 - Produção de escleródios maduros de cinco isolados de *Sclerotium delphinii* cultivados em diferentes meios de cultura

Meios de Cultura	Estatística	SMT 7	SMT 13	SMT 19	SMT 20	SMT 32
BDA	\bar{X}	1,62	0,19	3,43	3,92	11,78
	σ^2	4,10	0,28	5,85	22,78	83,63
E. malte-ágar	\bar{X}	0,51	0,31	9,99	0,08	16,13
	σ^2	0,42	0,22	45,60	0,06	106,10
V8-ágar	\bar{X}	22,47	5,83	19,73	6,50	30,74
	σ^2	118,40	197,88	36,01	195,13	724,73
Milho-ágar	\bar{X}	0,08	0	0,06	3,54	0
	σ^2	0,06	0	0,03	8,82	0
Aveia-ágar	\bar{X}	0,39	0	0,58	3,18	0,16
	σ^2	0,65	0	1,07	34,24	0,20

BDA = batata-dextrose-ágar; E. malte-ágar = extrato de malte-ágar.
NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

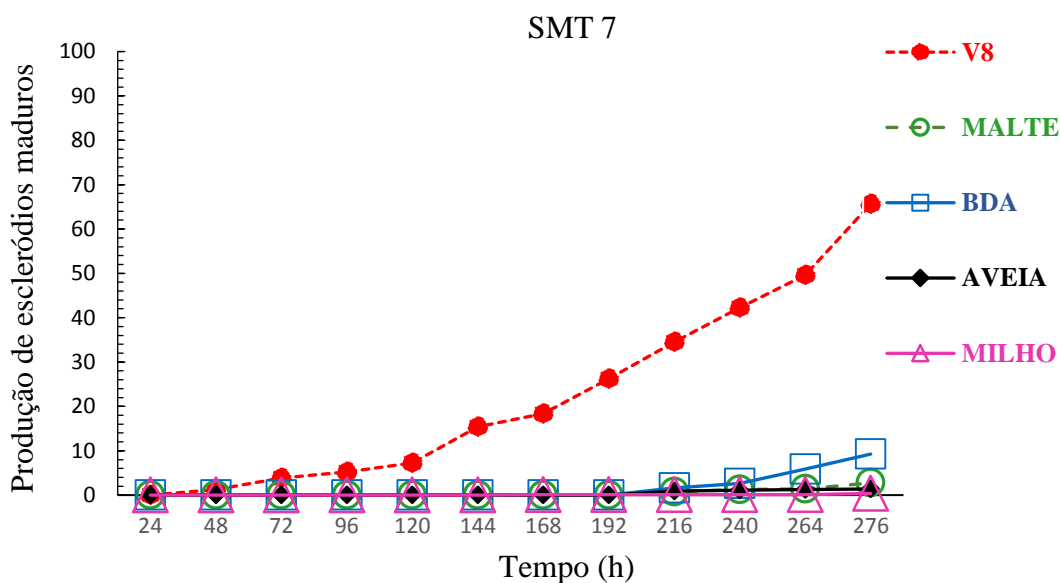
Figura 16 – Produção de escleródios imaturos do isolado SMT 7 de *Sclerotium delphinii* cultivado em diferentes meios de cultura.



Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

O isolado SMT 7 demonstrou dois grupos distintos em relação a produção de escleródios imaturos. O primeiro grupo formado pelos meios malte-ágar, milho-ágar e aveia-ágar mantiveram sua produção ao longo dos 21 dias de incubação abaixo de cinco escleródios produzidos por dia. Já os meios V8 e BDA foram o segundo grupo que tiveram o desempenho melhor em comparação aos outros três substratos. Durante os 21 dias de incubação o meio de cultura V8 manteve sua produção em constante oscilação chegando a atingir o pico mais alto de produção no oitavo dia. Depois do oitavo dia a produção de escleródios imaturos diminuiu exponencialmente. Já o BDA, apesar de produzir menos que o V8, se sobressaiu melhor em relação ao primeiro grupo. Assim como o meio V8, o BDA só iniciou a formação de escleródios imaturos a partir do oitavo dia de incubação e no décimo segundo essa produção acabou diminuindo até o final dos 21 dias (FIGURA 16).

Figura 17 – Produção de escleródios maduros do isolado SMT 7 de *Sclerotium delphinii* cultivado em diferentes meios de cultura.

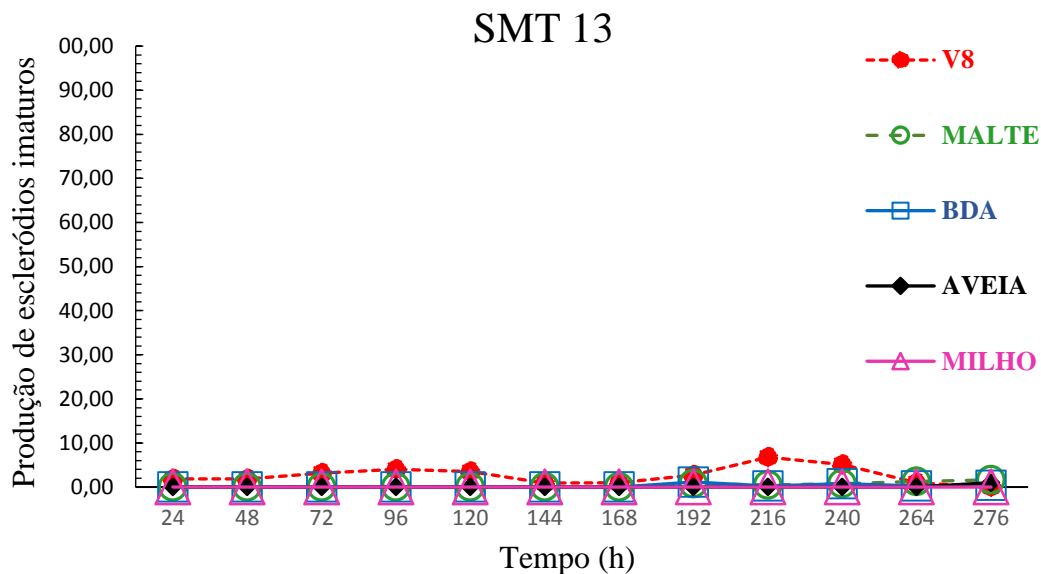


Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

Igualmente como na produção de escleródios imaturos, os dois grupos se mantiveram para a produção esclerocial dos maduros. O grupo que desenvolveu poucos escleródios maduros ou não produziu continuo sendo representado pelos meios malte-ágar, aveia-ágar e milho-ágar. O meio V8 iniciou sua produção a partir do segundo dia de leitura e se manteve em constante crescimento ao longo dos 10 dias finais de incubação. Apesar de o meio BDA ter formado

escleródios maduros, a quantidade foi bem abaixo dos escleródios produzidos no meio V8. Além disso, essa formação foi observada a partir do decimo dia de leitura, demonstrando que a resposta da produção esclerocial além de levar mais tempo para o amadurecimento dos escleródios, também apresenta baixa produção (FIGURA 17).

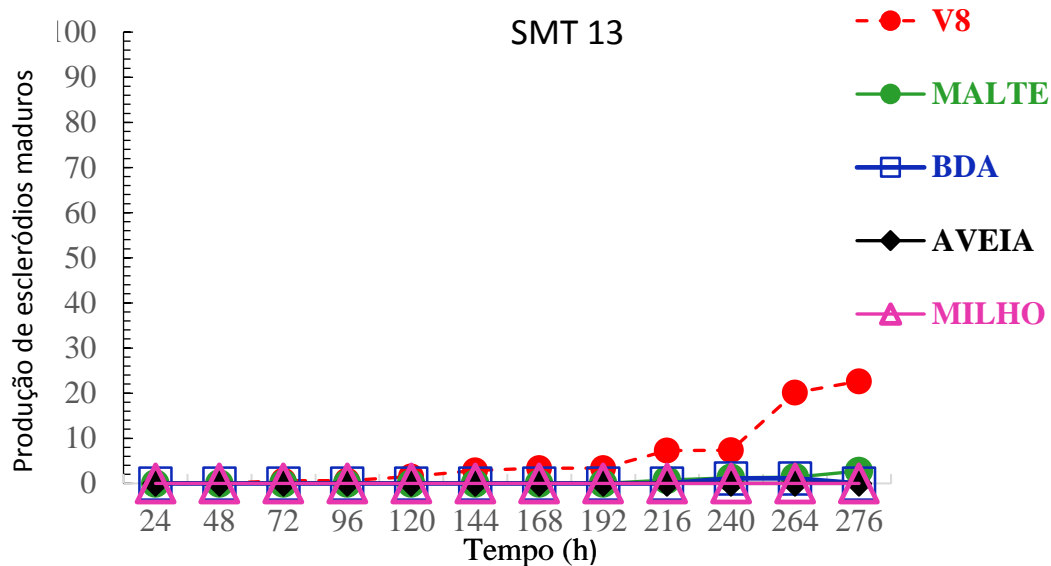
Figura 18 – Produção de escleródios imaturos do isolado SMT 13 de *Sclerotium delphinii* cultivado em diferentes meios de cultura.



Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

O isolado SMT 32 apesar de ter produzido alguns escleródios imaturos no meio de cultura V8-ágar não apresentou um bom desempenho de forma geral para os cinco substratos. Durante os 21 dias de incubação, foi apenas a partir do 12º que no meio de cultura V8 que se iniciou de fato a formação de escleródios imaturos. Essa produção ficou variando durante o período em que foram feitas as leituras atingindo seu pico maior de produção no 18º dia. Em relação aos outros substratos a produção foi quase nula e a resposta mais provável para esse tipo de comportamento está ligado com a necessidade nutricional de cada isolado. Para este isolado em específico os meios que contem altos níveis de carboidratos podem ter inibido a sua formação esclerocial, entretanto, buscando na literatura informações ou referencias não foi possível localizar autores que confirmem essa hipótese (FIGURA 18).

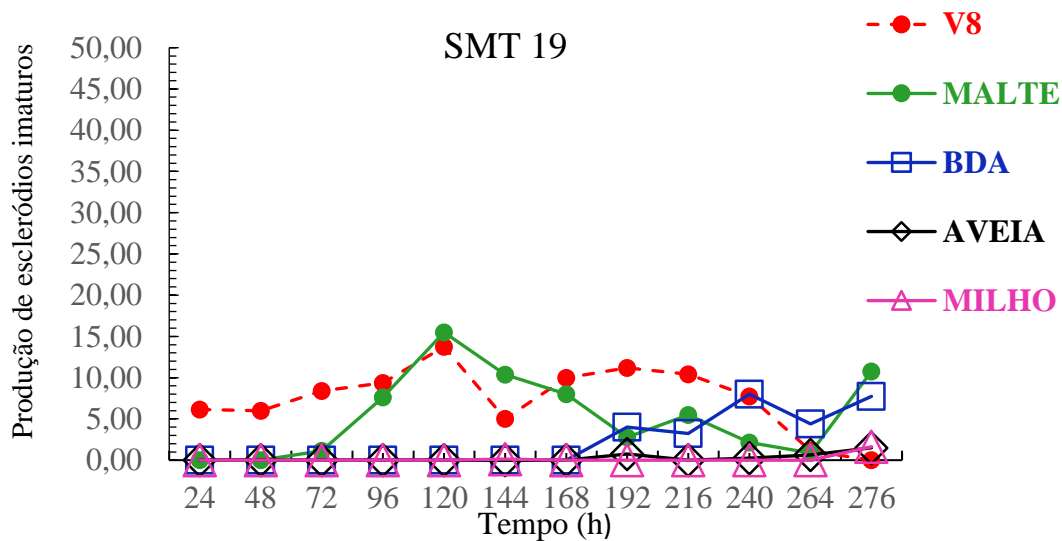
Figura 19 – Produção de escleródios maduros do isolado SMT 13 de *Sclerotium delphinii* cultivado em diferentes meios de cultura.



Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

A produção de escleródios maduros foi observada apenas nos meios V8 e malte-água. No 15º dia de incubação foi iniciada a formação dos escleródios maduros no meio V8 e no 18º dia no meio malte-água (FIGURA 19).

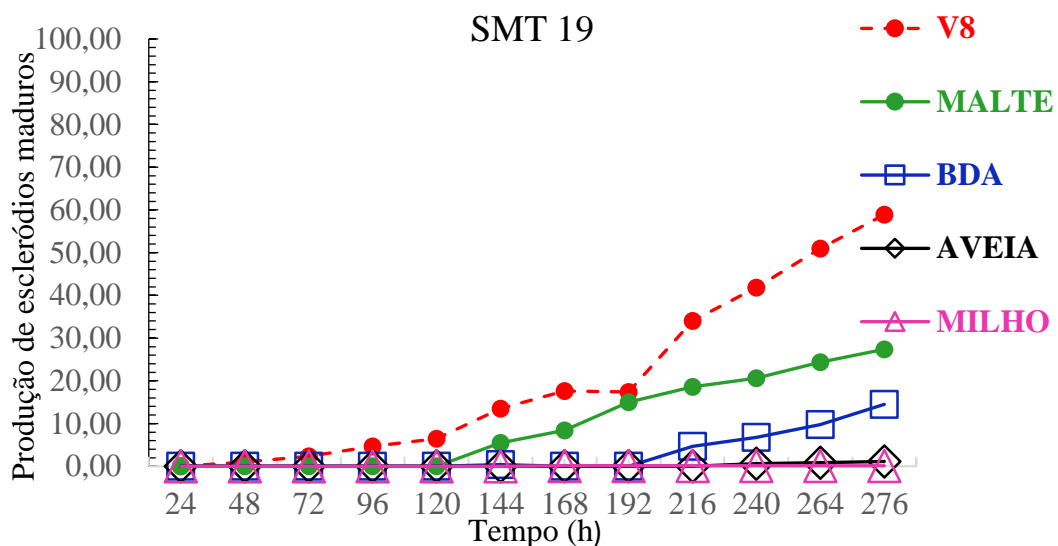
Figura 20 – Produção de escleródios imaturos do isolado SMT 19 de *Sclerotium delphinii* cultivado em diferentes meios de cultura.



Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

Para o SMT 19, a produção de escleródios imaturos foi melhor nos meios malte-ágar, BDA e V8. Essa produção se manteve constante durante os 12 dias em que se iniciou a leitura dos dados, começando a contagem da produção dos escleródios pelo meio de cultura V8 (10° dia), malte-ágar (13° dia) e por último BDA (17° dia). Os meios aveia-ágar e milho-ágar não induziram o isolado SMT 19 a formar enovelamentos e consequentemente escleródios imaturos (FIGURA 20).

Figura 21 – Produção de escleródios maduros do isolado SMT 19 de *Sclerotium delphinii* cultivado em diferentes meios de cultura.



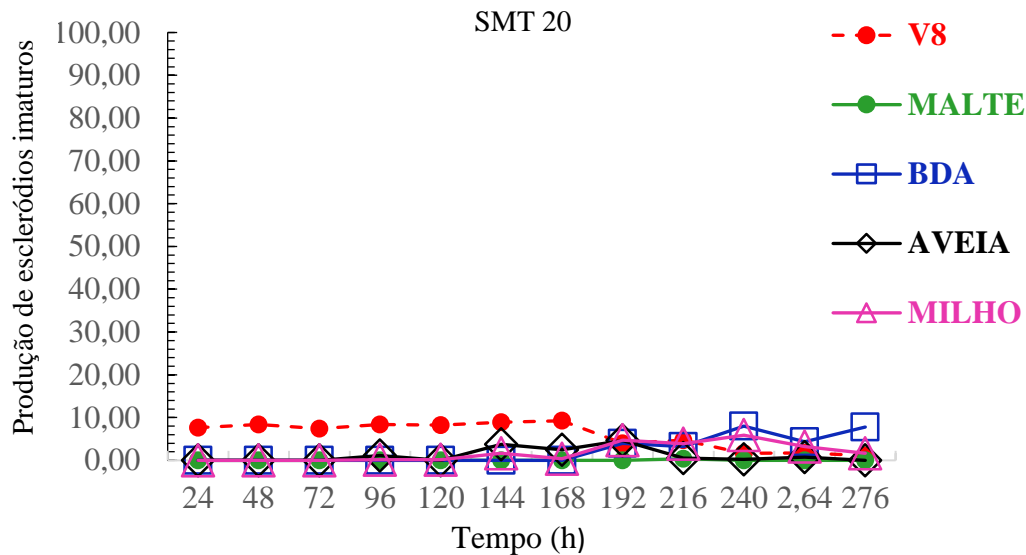
Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

Assim como na Figura 20, apenas os substratos BDA, malte e V8 produziram escleródios imaturos, consequentemente os meios que produziram escleródios maduros seriam os mesmos. O meio V8 foi o que mais produziu escleródios seguido do malte e por último o BDA. Ao longo dos 21 dias de incubação o meio V8 iniciou o amadurecimento do escleródios no 13° dia de leitura o que correspondeu a 72 desde a observação da formação de enovelamentos, o malte-ágar 144 horas e o BDA 216 horas.

Como há uma correlação entre a formação de escleródios imaturos com a formação de maduros, os meios que não produziram enovelamentos também não produziram escleródios maduros. Assim, os meios milho-ágar e aveia-ágar nos dois casos demonstraram não ser uma fonte da qual o fungo *S. delphinii* necessita exclusivamente para a formação de escleródios. Então novamente levanta-se a hipótese de que altas quantidades de carboidrato inibem ou não

estimulam o fungo *S. delphinii* a desenvolver tanto seu crescimento micelial quanto a formação esclerocial (FIGURA 21).

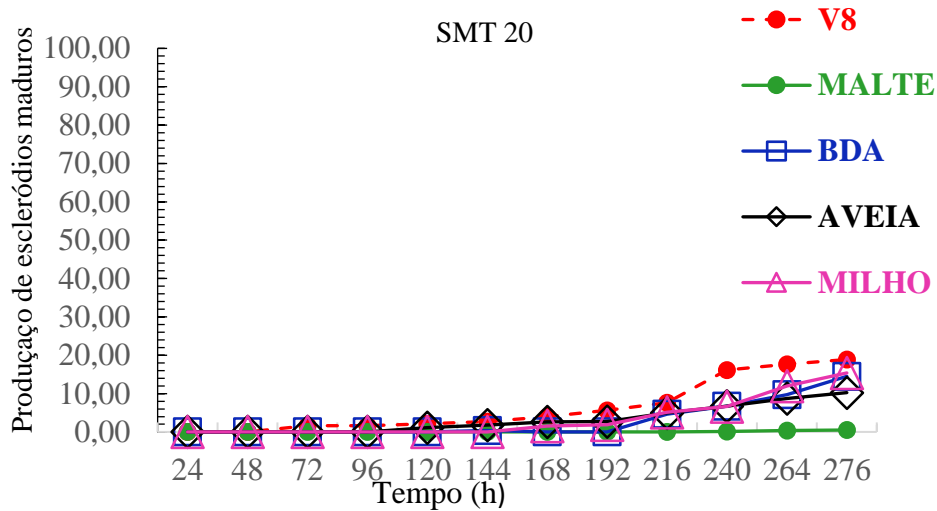
Figura 22 – Produção de escleródios imaturos do isolado SMT 20 de *Sclerotium delphinii* cultivado em diferentes meios de cultura.



Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

Para o isolado SMT 20 os cinco meios de cultura formaram escleródios imaturos, entretanto foi nos meios V8 e BDA que foi notado maior produção. Os escleródios imaturos começaram a se formar inicialmente no meio V8 logo no 10º dia de incubação e essa produção se manteve constante até 16º dia de leitura, após isso a produção decresceu ao longo do período de incubação. No milho-ágar a produção foi observada a partir do 13º dia, no aveia-ágar 13º, no BDA 17º dia e no malte-ágar a partir do 18º. Apesar de todos os meios terem produzidos escleródios o malte-ágar foi o único que teve uma quantidade quase insignificante de escleródios produzidos. (FIGURA 22).

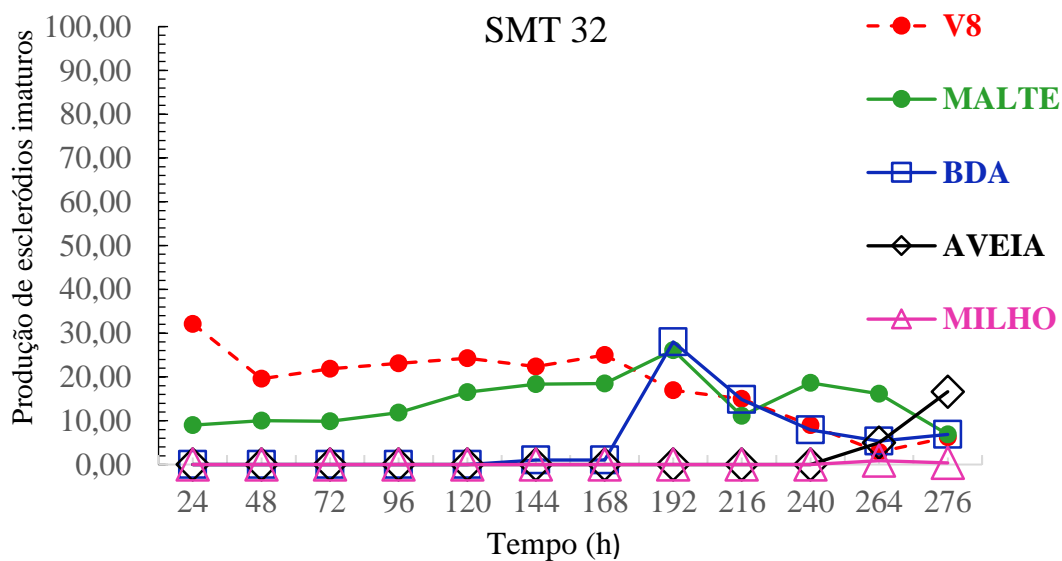
Figura 23 – Produção de escleródios maduros do isolado SMT 20 de *Sclerotium delphinii* cultivado em diferentes meios de cultura.



Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

Os escleródios maduros foram observados apenas nos meios V8, BDA, aveia-água e milho-água, os quatro substratos iniciando a produção no período de 144 horas. Já o meio malte-água formou escleródios maduros a partir de 216 horas, entretanto, uma quantidade insignificante (FIGURA 23).

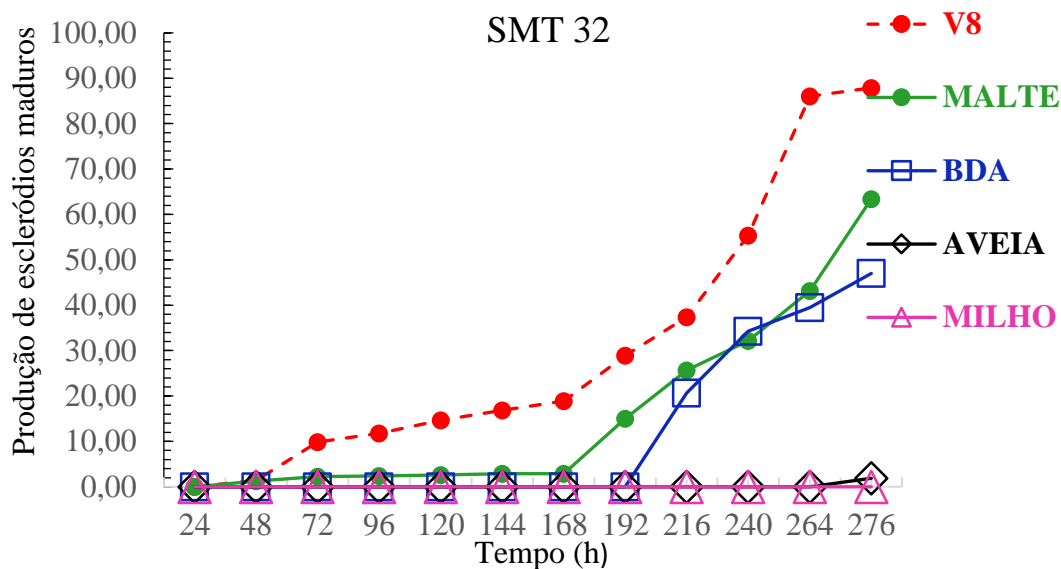
Figura 24 – Produção de escleródios imaturos do isolado SMT 32 de *Sclerotium delphinii* cultivado em diferentes meios de cultura.



Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

O isolado SMT 32 dentre todos os isolados foi o que mais produziu escleródios imaturos no seu estado inicial de incubação para os meios V8 e malte-ágar. O meio BDA no seu 6º dia disparou na frente dos outros meios, entretanto, no 9º dia caiu novamente. Já o malte-ágar só começou a expressar uma melhor produtividade a partir do 11º dia já no final da contagem do experimento. Os meios aveia-ágar e milho-ágar apesar de produzirem alguns escleródios no seu 11º dia de incubação não foram considerados ótimos em produção de escleródios imaturos para o isolado SMT 32 se comparados aos meios V8, malte-ágar e BDA (FIGURA 24).

Figura 25 – Produção de escleródios maduros do isolado SMT 32 de *Sclerotium delphinii* cultivado em diferentes meios de cultura.



Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

Os meios V8, BDA e malte-ágar para o isolado SMT 32 foram os melhores meios quando relacionados a produção de escleródios maduros. O meio V8 manteve uma linha constante de aumento na produção desde o seu 3º dia de incubação, seguido pelo meio malte-ágar e BDA. Os meios aveia-ágar e milho-ágar permaneceram até o final do período de incubação sem expressar valores consideráveis em relação a produção de escleródios maduros (FIGURA 25).

5.4 Produção de massa fresca e seca de escleródios de *Sclerotium delphinii*

Apesar de cada isolado apresentar respostas diferentes a cada meio de cultura, os

substratos V8, BDA e malte-ágar foram os que mais induziram o fungo a produzir escleródios, este resultado é semelhante ao de Punja e Damiani (1996), que obtiveram ótima produção de massa seca de escleródios de *S. delphinii* em BDA e V8. Generalizando-se, o meio de milho-ágar foi o que propiciou a menor produção de massa fresca e seca de escleródios maduros, seguido pelo de aveia-ágar (TABELAS 5 e 6). Serra e Silva (2004) testaram os meios de cultura aveia-ágar e milho-ágar para isolados de *S. rolfsii* e os resultados obtidos indicaram que esses substratos foram ótimos para a formação esclerocial, mostrando que apesar de os dois fungos serem do mesmo gênero, possuem variabilidade fisiológicas em respostas aos diferentes substratos.

Tabela 4 – Massa fresca de escleródios maduros de cinco isolados de *Sclerotium delphinii* cultivados em diferentes meios de cultura

Meios de Cultura	Estatística	SMT 7	SMT 13	SMT 19	SMT 20	SMT 32
BDA	\bar{X}	0,013	0,003	0,027	0,028	0,013
	σ^2	0	0	0	0	0
E. malte-ágar	\bar{X}	0,012	0,039	0,042	0,003	0,021
	σ^2	0	0	0,001	0	0
V8-ágar	\bar{X}	0,016	0,007	0,023	0,026	0,019
	σ^2	0	0	0	0	0
Milho-ágar	\bar{X}	0,001	0	0,001	0,083	0,002
	σ^2	0	0	0	0,013	0
Aveia-ágar	\bar{X}	0,001	0	0,001	0,194	0,001
	σ^2	0	0	0,013	0	0

BDA = batata-dextrose-ágar; E. malte-ágar = extrato de malte-ágar.

Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

Para os meios de BDA e extrato de malte, não se confirmou a tendência de que o isolado que formou o maior diâmetro produziu a maior massa seca. Por outro lado, nos meios de milho-ágar e aveia-ágar, para os isolados SMT 7, SMT 19 e SMT 32, observou-se que estes formaram o menor diâmetro e a menor massa seca.

Tabela 5 – Massa seca de escleródios maduros de cinco isolados de *Sclerotium delphinii* cultivados em diferentes meios de cultura

Meios de Cultura	Estatística	SMT 7	SMT 13	SMT 19	SMT 20	SMT 32
BDA	\bar{X}	0,012	0,003	0,027	0,028	0,013
	σ^2	0	0	0	0	0
E. malte-ágar	\bar{X}	0,012	0,039	0,042	0,003	0,021
	σ^2	0	0	0,001	0	0

V8-ágar	\bar{X}	0,016	0,007	0,023	0,026	0,019
	σ^2	0	0	0	0	0
Milho-ágar	\bar{X}	0,001	0	0,001	0,083	0,002
	σ^2	0	0	0	0,013	0
Aveia-ágar	\bar{X}	0,001	0	0,001	0,194	0,001
	σ^2	0	0	0,013	0	0

BDA = batata-dextrose-ágar; E. malte-ágar = extrato de malte-ágar.

Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

5.5 Diâmetro de escleródios maduros de *Sclerotium delphinii*

Para a maioria dos isolados de *Sclerotium delphinii*, BDA e extrato de malte foram os meios que formaram o maior diâmetro de escleródios maduros, entretanto, o meio de cultura aveia-ágar produziu um único escleródio no isolado SMT 20 de diâmetro de 7,23 milímetros. Obee (1942) descreve o diâmetro dos escleródios do fungo *S. delphinii* com tamanho de 4-5 milímetros nunca excedendo essa medida, e de fato isso se confirma para os escleródios produzidos meios V8-ágar, BDA, malte-ágar e milho-ágar. Como foi um único escleródio em uma única repetição, não se sabe ao certo o porquê deste comportamento. Além disso, os meios de cultura BDA e V8-ágar apresentaram escleródios com diâmetros que não ultrapassavam 2,4 mm. Este resultado também foi observado por Punja e Damiani (1996) que estudaram a morfologia e fisiologia dos fungo *S. rolfsii*, *S. coffeicola* e *S. delphinii*. Os menores diâmetros foram obtidos com o meio de milho-ágar e aveia-ágar. (TABELA 6).

Tabela 6 - Diâmetro de escleródios maduros de cinco isolados de *Sclerotium delphinii* cultivados em diferentes meios de cultura

Meios de Cultura	Estatística	SMT 7	SMT 13	SMT 19	SMT 20	SMT 32
BDA	\bar{X}	1,62	0,19	3,43	3,92	11,78
	σ^2	4,10	0,28	5,85	22,78	83,63
E. malte-ágar	\bar{X}	0,51	0,31	9,99	0,08	16,13
	σ^2	0,42	0,22	45,60	0,06	106,10
V8-ágar	\bar{X}	22,47	5,83	19,73	6,50	30,74
	σ^2	118,40	197,88	36,01	0,03	1,07
Milho-ágar	\bar{X}	0,08	0	0,06	3,54	0
	σ^2	0,06	0	0,03	8,82	34,24
Aveia-ágar	\bar{X}	0,39	0	0,58	3,18	0,16
	σ^2	0,65	0	1,07	34,24	0,20

BDA = batata-dextrose-ágar; E. malte-ágar = extrato de malte-ágar.

Fonte: NOGUEIRA, Renata Carvalho; SEVERO, Robinson (2019).

6 CONCLUSÕES

Diante das condições com que os ensaios foram conduzidos, conclui-se que:

A cor, agrupamento (enovelamento, cordão micelial), ramificação (hifa rizomorfa) e textura micelial, bem como a cor e formato dos escleródios dos isolados de *Sclerotium delphinii* diferiram conforme o meio de cultivo.

O crescimento micelial dos isolados de *Sclerotium delphinii* foi melhor quando cultivado no meio de cultura BDA.

A produção de escleródios dos isolados de *Sclerotium delphinii* foi melhor quando cultivado no meio de cultura V8-ágar.

A produção de massa fresca, massa seca e diâmetro de escleródios dos isolados de *Sclerotium delphinii* foi melhor quando cultivado no meio de cultura malte-ágar; o meio de BDA também destacou-se quanto ao diâmetro.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A.; MAFIA, R. G.; GONÇALVES, R. C. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Eds.). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2016. p. 55-92.

Carbon Sources, Growth, Sclerotium Formation and Carbohydrate Composition of
CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 51., 2019, RECIFE. Mancha zonada da pimenteira-do-reino: uma novidade sobre a etiologia.

Filho, H.P.S.; Selma, C.C.H.T.; Aristóteles, P.M.; Valéria, S.O.C.; Wellington, A.M.; Santos, C.C.F. Doenças, monitoramento e controle. In: **Embrapa informação tecnológica**. Cultura da mangueira. Brasília-Df, 2002, v. 2, cap.15. p. 452.

GARCIA, R. A.; JULIATTI, F. C.; CASSEMIRO, T. A. Produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (lib.) De bary Em meio de cultura. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 1-7, Jan./Feb. 2012.

GAWANDE, S.P.; BORKAR, S.G.; CHIMOTE, V.P.; NAGRALE, D.T.; SHARMA, A.K. Determination of morphometric, biochemical and genetic variation in *Sclerotium delphinii* isolates. **African Journal of Microbiology Research**, India, v.8, n.16, p.1696-1703, 2014.

HOMMA, A.K.O.; BAENA, A.R.C.; KATO, A.K.; FERREIRA, C.A.P.; CHU, E.Y.; ALBUQUERQUE, F.C.; HIDAKA, G.S.; CONCEIÇÃO, H.E.O.; OKAJIMA, H.; DUARTE, M.L.R.; POLTRONIERI, M.C.; KONAGANO, M.; FILHO, P.C.; MASCARENHAS, R.E.B.; OLIVEIRA, R.F.; ARAÚJO, S.M.B.; RODRIGUES, T.E.; BASTOS, T.X.; LEMOS, W.P.; ISHIZUKA, Y. **Cultivo da pimenta-do-reino na região Norte. Belém: Embrapa Amazônia Oriental**, 2004. 185p.

HUMPHERSON-JONE S.F, M COOKE; R.C. Effects of light on *Sclerotina sclerotium*, *Sclerotium delphinii* and *S. rolsii*. **New Phytol**, Sheffield, v. 78, p. 171-180, 1977).

JAVED, Z.U.R.; COLEY, J.R. Studies on germination of sclerotia of *Sclerotium delphinii*. **Trans. Br. Mycol. Soc.** v.60, n.3, p.441-451, 1973.

MENEZES, M.; SILVA-HALNLIN, D.M.W. Meios gerais para o cultivo de fungos fitopatogênicos. Imprensa universitária, UFRPE. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1997. v.1, cap.3, p.1-106.

MUKHERJEE, A.K.; MUKHERJEE, P.K.; KRANTHI, S. Identification of *Sclerotium delphinii* causing seedling rot in cotton. **Journal of Plant Pathology**, India, v.97, n.2, p.303-305, 2015.

OAKABE, I.; MATSUMOTO, N. Phylogenetic relationship of *Sclerotium rolfsii* (teleomorph *Athelia rolfsii*) and *S.delphinii* based on ITS sequences. **The British Mycological Society**, Japan, v.107, n.2, p.164-168, 2003.

OBEE, D.J. **Studies on *Sclerotium delphinii* welch with a consideration of ITS relationship to *Sclerotium rolfsii* sacc.** 1934, 87f. tese (Doutorado em filosofia). – Departamento de Botânica – Universidade do Kansas, Estados Unidos, 1934.

PALO, M.A. A sclerotium seed rot and seedling stem rot of mango. **Philippine jour. Of scl. Grã-Bretanha**, p. 52: 237-261. 1993.

PERLMAN, D. On the nutrition of *Sclerotium delphinii*. **American Journal of Botany**, California, v.35, n. p.360-363, 1948.

PUNJA, Z.K. Effect of carbon and nitrogen step-down on *Sclerotium* biomass and cord development in *Sclerotium rolfsii* and *Sclerotium delphinii*. **Trans. Br. mycol. Soc.** , v.86, n.8, p.537-544, 1986.

PUNJA, Z.K. The biology, ecology, and control of *Sclerotium rolfsii*. **Annual Reviews Phytopathol**, Califórnia, v.23, p.97-127, 1985.

PUNJA, Z.K.; DAMIANI, A. Comparative growth, morphology, and physiology of three *Sclerotium* species. **Mycological Society of America**, New York, v.88, n.5, p.694-706, 1996.

PUNJA, Z.K.; SUN, L.J. Genetic diversity among mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* (teleomorph *Athelia rolfsii*) and *S.delphinii*. **Mycological Research**, Canada, v.105, n.5, p.537-546, 2001.

RODRIGUES, M. I. S.; SANTOS FILHO, H. P Influência de diferentes regimes de temperatura x luz e multiespecificidade de cinco isolados de *Sclerotium* sp.

SACCAS, A. M. **La maladie des taches zonées de *Coffea excelsa* en Oubangui-Chani, due a *Sclerotium coffeicola* Stah. **Rewe de Mycologie**. Paris. v. 22. p. 65-64.1957.**

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

TAKAHASHI, T. A sclerotium disease of larkspur. **Phytopath.** 17: p. 239-245. 1927.

XU, Z.; GLEASON, M.L.; MUELLER, D.S.; ESKER, P.D.; BRADLEY, C.A.; BUCK, J.W.; BENSON, D.M.; DIXON, P.M.; MONTEIRO, J.E.B.A. Overwintering of *Sclerotium rolfsii* var. *Delphinii* in different latitudes of the United States. **Plant Disease**, United States, v.92, n.5, p.719-724, 2008.

ZANG, M.; WANG, X.J.; LI, Y.; GENG, Y.H.; WU, H.Y. First Report of Branch Rot of *Lonicera japonica* Caused by *Sclerotium delphinii* in China. **Plant Disease**, China, v.98, n.8, 2014. (abstract 1155).