

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FAULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO DA REAÇÃO DE
CULTIVARES DE SOJA À *Fusarium tucumaniae***

Helena Baroni Junqueira Franco

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Pessôa da Cruz Centurion

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Agronomia (Produção Vegetal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Maio de 2007

F825m Franco, Helena Baroni Junqueira
Metodologias para determinação da reação de cultivares de soja
à *Fusarium tucumaniae*. / Helena Baroni Junqueira Franco. – –
Jaboticabal, 2007
xii, 88 f.: il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007
Orientadora: Maria Aparecida Pessôa da Cruz Centurion
Banca examinadora: Maria Aparecida Pessôa da Cruz
Centurion, Vanoli Fronza, Antônio Orlando Di Mauro
Bibliografia

1. Podridão vermelha da raiz (PVR). 2. *Glycine max* (L.) Merrill.
3. Métodos de inoculação artificial. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.34:632.25

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

HELENA BARONI JUNQUEIRA FRANCO – nascida em 20 de maio de 1982, em Monte Azul Paulista – SP. Em 2000 ingressou no curso de Agronomia, na Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCVA/UNESP), Jaboticabal – SP, obtendo o título de Engenheira Agrônoma em 4 de março de 2005. Durante a graduação estagiou no Departamento de Produção Vegetal, sob orientação da professora Dra. Maria Aparecida Pessôa da Cruz Centurion, e foi bolsista da FAPESP (Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo). Desenvolveu trabalhos científicos envolvendo o manejo da cultura da soja. Em 7 de março de 2005 ingressou no mestrado, no curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal, pela Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), Jaboticabal – SP, mantendo a mesma linha de pesquisa iniciada durante a graduação, com auxílio financeiro da FAPESP.

“Para ser grande, sê inteiro:
Nada teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.
Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda brilha,
Porque alta vive.”

(Fernando Pessoa)

Aos meus familiares pelo amor, carinho, compreensão e ensinamentos que me fizeram chegar até aqui.

DEDICO

Ao meu marido, Miguel, pelo grande companheirismo, paciência e amor destes anos juntos.

OFEREÇO

À minha orientadora e sempre amiga, Maria Aparecida, pela confiança, auxílio e ensinamentos que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

HOMENAGEIO

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), Jaboticabal – SP e ao Departamento de Produção Vegetal, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

À FAPESP, pela concessão da bolsa para realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Maria Aparecida Pessoa da Cruz Centurion, pela competência com que orientou esta dissertação, pela confiança, conhecimentos compartilhados, e pela amizade.

Ao Prof. Barbosa, pela ajuda com as análises estatísticas.

A todos professores e funcionários do Departamento de Produção Vegetal que ajudaram na realização deste trabalho.

Às secretárias Mariângela e Marisa, por sempre tornarem as coisas menos difíceis.

Aos meus amigos em geral, principalmente Tereza, Mariluce, Mariana(s), Amanda, pelo auxílio, amizade e agradável convivência.

Aos meus pais e irmãos, pela luta, apoio e incentivo.

Ao Miguel pelo amor, carinho, paciência, incentivo e compreensão nestes anos.

A banca examinadora, pelas sugestões e correções para a melhoria da dissertação.

À Deus, que pela fé e crença que temos, permite que as dificuldades e obstáculos da vida sejam enfrentados de maneira mais serena.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram e consideram-se responsáveis pela realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

MUITO OBRIGADA.....

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
SUMMARY	xii
CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	01
1.1. Introdução.....	01
1.2. Distribuição geográfica e importância econômica da podridão vermelha da raiz da soja (PVR)	02
1.3. Etiologia, epidemiologia e sintomatologia.....	04
1.4. Métodos para identificação da reação de cultivares de soja a PVR.....	08
1.5. O método da folha destacada.....	12
CAPÍTULO 2. Avaliação do desenvolvimento de <i>Fusarium tucumaniae</i> em diferentes meios de cultura	14
Resumo	14
Introdução.....	15
Material e métodos	16
1. Obtenção e manutenção do inóculo	16
2. Avaliação do desenvolvimento de <i>F. tucumaniae</i> em diferentes meios de cultura.....	17
3. Análises estatísticas dos resultados	18
Resultados e discussão.....	18
1. Avaliação do desenvolvimento de <i>F. tucumaniae</i> em diferentes meios de cultura.....	18
Conclusões.....	22
CAPÍTULO 3. Avaliação de métodos de inoculação de <i>Fusarium tucumaniae</i> em folhas destacadas e em plântulas de soja cultivadas em casa de vegetação no outono/inverno-2005 e primavera/verão-2005/2006.....	23
Resumo	23

Introdução.....	24
Material e métodos	25
1. Avaliação de diferentes métodos de inoculação em folhas destacadas	25
1.1. Avaliação dos métodos de inoculação em folhas destacadas enraizadas em papel de filtro e em terra	25
2. Avaliação de métodos de inoculação em plântulas cultivadas em casa de vegetação	27
3. Análises estatísticas dos resultados	30
Resultados e discussão	30
1. Avaliação de diferentes métodos de inoculação em folhas destacadas	30
1.1. Avaliação dos métodos de inoculação em folhas destacadas enraizadas em papel de filtro e em terra	30
2. Avaliação de métodos de inoculação em plântulas cultivadas em casa de vegetação – outono/inverno 2005	35
3. Avaliação de métodos de inoculação em plântulas cultivadas em casa de vegetação – primavera/verão 2005/2006	48
Conclusões	58
CAPÍTULO 4. Reação de cultivares de soja a <i>Fusarium tucumaniae</i> avaliadas em folhas destacadas e em casa de vegetação	59
Resumo	59
Introdução.....	60
Material e métodos	62
1.1. Reação de cultivares de soja a <i>F. tucumaniae</i> avaliadas em folhas destacadas	62
1.2. Reação de cultivares de soja a <i>F. tucumaniae</i> avaliadas em plântulas	63
2. Análises estatísticas dos resultados	65
Resultados e discussão	65
1.1. Reação de cultivares de soja a <i>F. tucumaniae</i> avaliadas em folhas destacadas	65
1.2. Reação de cultivares de soja a <i>F. tucumaniae</i> avaliadas em plântulas	68

1.2.1. Avaliação dos sintomas da parte aérea	68
1.2.2. Avaliação dos sintomas no sistema radicular	73
1.2.3. Análises de correlação	75
1.2.4. Considerações finais	76
...Conclusões	78
REFERÊNCIAS	79

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 2.

Tabela 1. Número médio de esporos de <i>Fusarium tucumaniae</i> em diferentes meios de cultura e ambientes, aos 15 e 30 dias após a repicagem do fungo.....	19
---	----

CAPÍTULO 3.

Tabela 1. Nível de infecção de <i>Fusarium tucumaniae</i> obtidos em folhas destacadas, de quatro variedades de soja inoculadas por diferentes métodos e incubadas em dois substratos e duas temperaturas.....	31
--	----

Tabela 2. Nível de infecção de <i>Fusarium tucumaniae</i> em folhas destacadas de soja, na interação de variedades dentro de ambientes na primeira, segunda e terceira avaliações.....	33
--	----

Tabela 3. Nível de infecção de <i>Fusarium tucumaniae</i> em folhas destacadas de soja, na interação de métodos dentro de ambientes na primeira, segunda e terceira avaliações.....	34
---	----

Tabela 4. Nível de infecção de <i>Fusarium tucumaniae</i> em folhas destacadas de soja, na interação de métodos dentro de variedades na segunda e terceira avaliações.....	35
--	----

Tabela 5. Severidade dos sintomas foliares (SSF) e nível de infecção (NI) obtidos na sexta avaliação, de variedades de soja cultivadas no outono/inverno, em condições de casa de vegetação e inoculadas com <i>Fusarium tucumaniae</i> , pelos métodos do palito de dente (PD), discos de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS) colonizados.....	39
---	----

- Tabela 6. Comprimento (cm) da lesão externa (LE), lesão interna (LI) e altura (cm) (AL) de plântulas de soja cultivadas em casa de vegetação (outono/inverno) e inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, pelos métodos do palito de dente (PD), disco de colônia (DC), grão de aveia (GA) e grão de sorgo (GS).....41
- Tabela 7. Porcentagem de plântulas mortas (%PM) obtidas em variedades de soja inoculadas com *Fusarium tucumaniae* (outono/inverno) pelos métodos do palito de dente (PD), disco de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS), em condições de casa de vegetação (outono/inverno).....43
- Tabela 8. Nível de infecção de raiz de plântulas de soja cultivadas em casa de vegetação (outono/inverno) e inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, pelos métodos do palito de dente (PD), disco de colônia (DC), grão de aveia (GA) e grão de sorgo (GS).....44
- Tabela 9. Massa seca de raiz (g) de plântulas de soja cultivadas em casa de vegetação (outono/inverno) e inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, pelos métodos do palito de dente (PD), discos de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS).....45
- Tabela 10. Coeficientes de correlação entre nível de infecção (NI) de *Fusarium tucumaniae*, severidade dos sintomas foliares (SSF), porcentagem de plântulas mortas (%PM), nível de infecção de raiz (NIR) e massa seca de raiz (MSR), em plântulas de soja inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, para o método do palito de dente, disco de colônia, grãos de aveia e grãos de sorgo (outono/inverno).....47
- Tabela 11. Comprimento (cm) da lesão externa (LE), lesão interna (LI) e altura (cm) (AL) de plântulas de soja cultivadas em casa de vegetação (primavera/verão) e inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, pelos métodos

do palito de dente (PD), disco de colônia (DC), grão de aveia (GA) e grão de sorgo (GS).....51

Tabela 12. Porcentagem de plântulas mortas (%PM) obtidas em variedades de soja inoculados com *Fusarium tucumaniae* pelos métodos do palito de dente (PD), disco de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS), em condições de casa de vegetação (primavera/verão).....52

Tabela 13. Nível de infecção de raiz de plântulas de soja cultivadas em casa de vegetação (primavera/verão) e inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, pelos métodos do palito de dente (PD), disco de colônia (DC), grão de aveia (GA) e grão de sorgo (GS).....53

Tabela 14. Massa seca de raiz (g) de plântulas de soja cultivadas em casa de vegetação (primavera/verão) e inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, pelos métodos do palito de dente (PD), discos de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS).....54

Tabela 15. Coeficientes de correlação entre nível de infecção (NI), severidade dos sintomas foliares (SSF), porcentagem de plântulas mortas (%PM), nível de infecção de raiz (NIR) e massa seca de raiz (MSR) em plântulas de soja inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, para o método do palito de dente, disco de colônia, grãos de aveia e grãos de sorgo.....56

CAPÍTULO 4.

Tabela 1. Nível de infecção de *Fusarium tucumaniae* obtidas em folhas destacadas, de sete cultivares de soja inoculadas pelo método de grãos de aveia e incubadas em solo em duas temperaturas.....66

Tabela 2. Nível de infecção de <i>Fusarium tucumaniae</i> em folhas destacadas de soja, na interação de tratamentos dentro de temperaturas na primeira, segunda e terceira avaliações.....	67
Tabela 3. Severidade dos sintomas foliares (SSF) e nível de infecção (NI) de <i>Fusarium tucumaniae</i> obtidos na sexta avaliação, em variedades de soja cultivadas no outono/inverno em condições de casa de vegetação, inoculadas pelo método de grãos de sorgo (GS) colonizados.....	70
Tabela 4. Porcentagem de plântulas mortas (%PM), comprimento (cm) da lesão externa (LE) e lesão interna (LI) obtidas em variedades de soja inoculadas com <i>Fusarium tucumaniae</i> pelo método de grãos de sorgo(GS), em condições de casa de vegetação (outono/inverno).....	72
Tabela 5. Altura (cm) (AL) de plântulas de soja cultivadas em casa de vegetação (outono/inverno) inoculadas com <i>Fusarium tucumaniae</i> , pelo método de grãos de sorgo (GS).....	73
Tabela 6. Nível de infecção de raiz de plântulas de soja cultivadas em casa de vegetação (outono/inverno) e inoculadas com <i>Fusarium tucumaniae</i> , pelo método de grãos de sorgo (GS).....	74
Tabela 7. Massa seca de raiz (g) de plântulas de soja cultivadas em casa de vegetação (outono/inverno) inoculadas com <i>Fusarium tucumaniae</i> , pelo método de grãos de sorgo (GS).....	74
Tabela 8. Coeficientes de correlação entre nível de infecção (NI), severidade dos sintomas foliares (SSF), porcentagem de plântulas mortas (%PM), nível de infecção de raiz (NIR), massa seca de raiz (MSR), altura de plantas (AL),	

lesão externa na haste (LE) e lesão interna na haste (LI) em plântulas de soja inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, para o método de grãos de sorgo.....75

Tabela 9. Coeficientes de correlação entre nível de infecção de *Fusarium tucumaniae* em casa de vegetação(NI CV), em folha destacada a 15°C (NI FD 15°C) e folha destacada a 25°C (NI FD 25°C), para o método de grãos de sorgo.....76

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 2.

Figura 1. Aspecto da colônia de *Fusarium tucumaniae* utilizada para transferência de discos para os erlenmeyers.....19

Figura 2. Aspecto das culturas de *Fusarium tucumaniae*, em meios de grãos de aveia (a), e grãos de sorgo (b), mantidos no claro, e de grãos de sorgo (c) e de aveia (d) mantidos no escuro, 15 dias após a repicagem.....20

Figura 3. Aspecto das culturas de *Fusarium tucumaniae*, em meios de grãos de aveia (a), e de grãos de sorgo (b), mantidos no claro, e de grãos de sorgo (c) e de aveia (d) mantidos no escuro, 30 dias após a repicagem.....20

CAPÍTULO 3.

Figura 1. Nível de infecção (NI) obtidos em seis avaliações de variedades de soja cultivadas no outono/inverno, em condições de casa de vegetação, inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, pelos métodos do palito de dente (PD), discos de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS) colonizados.....37

Figura 2. Severidade dos sintomas foliares (SSF) observados em seis avaliações de variedades de soja cultivadas no outono/inverno, em condições de casa de vegetação inoculadas com *Fusarium tucumaniae* pelos métodos do palito de dente (PD), discos de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS) colonizados.....38

Figura 3. Sintomas observados na cultivar FT-Cristalina inoculada (vaso esquerda) com *F. tucumaniae* pelo método do grão de sorgo, e testemunha (vaso direita) em condição de casa de vegetação.....42

Figura 4. Notas utilizadas para avaliação do nível de infecção de raízes. Da esquerda para direita, notas 1, 2 e 3, onde 1= raiz sem sintoma; 2= raiz pivotante totalmente ou parcialmente necrosada, porém com raízes secundárias normais; 3= sistema radicular totalmente necrosado.....46

Figura 5. Nível de infecção (NI) de *Fusarium tucumaniae* obtidas em variedades de soja cultivadas na primavera/verão em condições de casa de vegetação, inoculadas pelos métodos do palito de dente (PD), discos de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS) colonizados.....49

Figura 6. Severidade dos sintomas foliares (SSF) de *Fusarium tucumaniae* obtidas em variedades de soja cultivadas na primavera/verão em condições de casa de vegetação, inoculadas pelos métodos do palito de dente (PD), discos de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS) colonizados.....50

CAPÍTULO 4.

Figura 1. Nível de infecção (NI), de *Fusarium tucumaniae* obtidos em variedades de soja cultivadas no outono/inverno em condições de casa de vegetação, inoculadas pelo método de grãos de sorgo (GS) colonizados.....68

Figura 2. Severidade dos sintomas foliares (SSF), de *Fusarium tucumaniae* em variedades de soja cultivadas no outono/inverno em condições de casa de vegetação, inoculadas pelo método de grãos de sorgo (GS) colonizados.....69

METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO DA REAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA À *Fusarium tucumaniae*

RESUMO – Objetivou-se estudar diferentes metodologias de inoculação de *Fusarium tucumaniae* em folhas destacadas e em plântulas de soja, visando à caracterização da reação de resistência de cultivares de soja à *F. tucumaniae*. O trabalho foi desenvolvido em diferentes etapas relacionadas a seguir: obtenção e manutenção do inóculo; avaliação do desenvolvimento do patógeno em diferentes meios de cultura e diferentes luminosidades; avaliação de diferentes métodos de inoculação em folhas destacadas acondicionadas em papel de filtro e em solo, incubadas em duas temperaturas; avaliação de métodos de inoculação em plântulas cultivadas em casa de vegetação (primavera/verão e outono/inverno), reação de cultivares de soja a *F. tucumaniae* avaliadas em folhas destacadas, reação de cultivares de soja a *F. tucumaniae* avaliadas em plântulas (outono/inverno). As análises dos resultados permitiram concluir maior esporulação do fungo em meio de grãos de sorgo. As metodologias de inoculação de plântulas foram bem sucedidas na época de outono/inverno 2005, observando-se infecção das plântulas, principalmente de variedades suscetíveis, e os sintomas típicos da doença ocorreram em todos os métodos utilizados. FT-Cristalina apresentou maior nível de infecção da planta, para o método de grãos de sorgo (GS). O método de inoculação, em folhas destacadas, com grãos de aveia, promoveu maior infecção nas folhas e, o ambiente mais propício ao desenvolvimento dos sintomas da doença foi o solo a 23°C. A cultivar FT-Estrela apresentou 90,2% de plântulas mortas, e CAC-1 46,9% (método GS). No método da folha destacada não foi possível caracterizar a reação das cultivares estudadas.

Palavras-Chave: podridão vermelha da raiz (PVR), métodos de inoculação artificial, *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, folha destacada, *Glycine max* (L.) Merrill

METHODOLOGIES TO DETERMINE SOYBEAN CULTIVARS REACTION TO *Fusarium tucumaniae*

SUMMARY – Detached leaves and seedlings of some cultivars were inoculated with *F. tucumaniae* using different methodologies in order to evaluate their resistance reaction. The conduction of the research work consisted of the following phases: obtainment and maintenance of the isolate, evaluation of the pathogen growth and sporulation in different culture media and luminosity; evaluation of different inoculation methods in detached leaves conditioned either in filter paper and soil being, incubated under two temperatures; evaluation of inoculation methods in soybean seedlings developed in greenhouse (Spring/Summer and Autumn/Winter); reaction of soybean cultivars to *F. tucumaniae* evaluated in detached leaves; reaction of soybean cultivars to *F. tucumaniae* evaluated in seedling (Autumn/Winter). The obtained results showed that the fungus sporulation was more intense when grown in a sorghum grain medium. Inoculation methodologies in seedlings showed best results when carried out during the 2005 Autumn/Winter period, because seedlings infection was observed, mainly in the susceptible cultivars, and all the employed methods allowed observation of the disease typical symptoms. FT-Cristalina was the cultivar in which the highest level of plant infection was observed, when the sorghum grain method (GS) was employed. The oat grain inoculation method in detached leaves, led to the highest leaf infection index, and the environmental condition which allowed the highest degree of leaf infection was in the soil under 23°C. FT-Estrela cultivar had 90.2% of their seedlings dead whereas for the CAC-1 cultivar that value was of 46.9% (method GS). Cultivars reaction could not be evaluated by means of the detached leaf method.

Keywords: sudden death syndrome (SDS), methodologies of artificial inoculation, *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, detached leaf, *Glycine max* (L.) Merrill

CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1. Introdução

Cultivares de soja foram desenvolvidas para diferentes latitudes e os mais variados tipos de solo e condições climáticas, porém, a exploração econômica do seu potencial produtivo, que permite rendimentos superiores a 4.000 kg/ha, dificilmente é alcançada pelos agricultores (FRONZA, 2003).

Entre os principais fatores limitantes à obtenção de elevados rendimentos, está a ocorrência de doenças. Cerca de 40 doenças da soja já foram identificadas no Brasil, abrangendo aquelas provocadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides. A expansão de áreas irrigadas no cerrado tem possibilitado o cultivo da soja no outono/inverno para a produção de sementes, favorecendo a sobrevivência de fitopatógenos, como os nematóides de galhas (*Meloidogyne* sp.), o nematóide de cisto (*Heterodera glycines*) e os fungos causadores da antracnose (*Colletotrichum truncatum*), do cancro da haste (*Diaphorthe phaseolorum* f.sp. *meridionalis*), da podridão de Sclerotinia (*Sclerotinia sclerotiorum*) e da podridão vermelha da raiz (PVR), causada por *Fusarium solani* f.sp. *glycines* (EMBRAPA, 2003).

Uma doença que atualmente tem merecido atenção dos fitopatologistas e melhoristas é a podridão vermelha da raiz (PVR), também conhecida por síndrome da morte súbita (SMS), por causar severas perdas na produção de soja nas Américas do Norte e do Sul. Observada pela primeira vez no Brasil na safra 1981/82 em São Gotardo - MG (YORINORI et al., 1993), tem apresentado crescente aumento em área e severidade desde sua constatação. Segundo estimativa de YORINORI (2000a) mais de 2 milhões de hectares foram infectados na safra 1999/2000, sendo o uso de cultivares resistentes a melhor expectativa de controle da PVR e de convivência com o patógeno causador da doença. Pela provável natureza poligênica do controle da resistência e pela grande influência do ambiente na intensidade de manifestação dos sintomas, aliados ao fato da inexistência de um método de controle químico ou cultural eficiente, a

PVR tornou-se, sem dúvida, uma grande preocupação para os sojicultores, técnicos e pesquisadores nas regiões onde sua ocorrência foi constatada (FRONZA, 2003).

1.2. Distribuição geográfica e importância econômica da podridão vermelha da raiz da soja (PVR)

A podridão vermelha da raiz (PVR), é uma doença relativamente nova, tendo sido observada pela primeira vez em Arkansas em 1971, por H. J. Walters. Parecia estar limitada ao Arkansas, até que foi constatada em várias províncias do Mississippi, Missouri, Kentucky e Tennessee em 1984 (RUPE et al., 1989; YANG & RIZVI, 1994; ROY et al., 1997). Esta doença tem sido relatada nas maiores regiões produtoras de soja desde a América do Norte até a América do Sul (NAKAJIMA et al., 1993; RUPE et al., 2001). Por volta de 1986, a PVR foi encontrada em Illinois (EATHINGTON et al., 1993) e Indiana, e sua atual distribuição nos E.U.A agora também inclui Alabama, Georgia, Iowa, Kansas, Ohio e Wisconsin (ROY et al., 1989; ROY et al., 1991; ROY et al., 1997; RUPE, 1989; RUPE et al., 1989; JARDINE & RUPE, 1993; YANG & RIZVI, 1994).

Até meados da década de 90, além dos Estados Unidos, a PVR só era encontrada na Argentina (ROY et al., 1997) e no Brasil (NAKAJIMA et al., 1993), causando prejuízos consideráveis aos sojicultores. Posteriormente, foi identificada também no Canadá (ANDERSON et al., 1998) e, na safra de outono/inverno de 2001, foi constatada pela primeira vez na Bolívia (YORINORI, 2002).

As perdas de produção decorrentes da síndrome da morte súbita dependem especialmente do estágio de desenvolvimento da planta por ocasião da infecção, da reação da cultivar, e das condições ambiente. Nos E.U.A, perdas de até 80% em campos individuais têm sido atribuídas a esta doença, mas perdas em torno de 5 a 15% são mais comuns (RUPE et al., 1989; HERSHMAN et al., 1990). Em 1994, na Argentina, a SMS causou perdas estimadas em até 90% em campos individuais e uma perda de 134.000 toneladas (WRATHER et al., 1997), equivalendo a, aproximadamente US\$ 30 milhões. Em 1996, plantas com sintomas da SMS, foram observadas em seis campos

de municípios do Canadá, e embora as perdas de produção tenham sido difíceis de avaliar devido a distribuição espalhada das plantas doentes, observaram-se poucas vagens mal granadas. Embora as perdas de produção sejam atualmente baixas é evidente que *F. solani* f. sp. *glycines* distribuiu-se amplamente no sudoeste de Ontário/Canadá e a doença está aumentando rapidamente, concluíram, ainda na década de 1990, ANDERSON et al. (1998).

No Brasil, durante muitos anos a SMS ficou restrita às lavouras da região de São Gotardo, onde foi inicialmente constatada. A partir do final da década de 1980, passou a chamar a atenção em diversas lavouras do Sul do Paraná, Rio Grande do Sul (Chapadão do Sul) e Goiás (Chapadão do Céu) (YORINORI, 2000a; EMBRAPA, 2001). Perdas decorrentes da SMS aumentaram consideravelmente no Brasil entre 1991 e 1994, chegando a atingir até 40%. Na safra 1994/95, as perdas provocadas pela doença no Brasil foram estimadas em 15.000 t, equivalendo a US\$ 3,2 milhões (WRATHER et al., 1997; YORINORI, 1997b). Em levantamentos feitos em diversas propriedades e áreas experimentais na safra 1996/97, a incidência da PVR, avaliada pela porcentagem de plantas mortas ou com raízes atacadas, alcançou níveis de até 100%, com as perdas variando de insignificantes a mais de 30% (YORINORI & HIROMOTO, 1998). Segundo GÁSPERI (2000), comparando-se parcelas experimentais de plantas sintomáticas com assintomáticas, em quatro lavouras comerciais, as perdas de rendimentos dos grãos variaram de 29 a 51%, enquanto o peso de mil sementes sofreu reduções de 6 a 19%. Em levantamento feito na safra 1999/2000, estimaram-se perdas de US\$ 52,9 milhões em uma área afetada de mais de dois milhões de hectares em 99 municípios brasileiros (YORINORI, 2000b; YORINORI, 2002). Pela dificuldade de controle, o autor comentou que, atualmente, a PVR é a doença mais preocupante na cultura da soja no Brasil, colocando-a até mesmo à frente da ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*), considerada a doença mais temida em termos mundiais e, cuja ocorrência, foi constatada no Brasil na safra 2000/01.

Atualmente, a PVR é encontrada desde o Rio Grande do Sul até o Maranhão, sendo o Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e Minas Gerais os estados mais afetados (EMBRAPA, 2001). A doença é mais

severa na região sul e no cerrado, acima de 700m de altitude. Além da soja, lavouras de feijão, irrigadas com pivô central em Patos de Minas e Coromandel (MG) e em Luziânia (GO), já foram seriamente afetadas pela PVR (EMBRAPA, 1996). Em Monte Carmelo (MG), foram observadas lavouras com até 100% de plantas infectadas, com redução no rendimento da ordem de 64%.

Dependendo da época de difusão e da severidade de ataque, a PVR pode causar perda pequena ou total da produção, resultante da queda prematura de flores e vagens, seca de vagens e redução do tamanho das sementes (RUPE et al., 1989; STEPHENS et al., 1993c).

No futuro, o controle da PVR deverá ser conseguido através do uso de cultivares resistentes e em conjunto com práticas de manejo (YORINORI, 1997b). Hoje há poucos genótipos de soja adaptados a região do cerrado com resistência à podridão vermelha da raiz. A identificação de outros genótipos tolerantes certamente trará grande contribuição, visto que poderá minimizar os prejuízos causados aos produtores.

1.3. Etiologia, epidemiologia e sintomatologia

O gênero *Fusarium* possui uma taxonomia complexa dividida em seções, *forma specialis* e raças. Dentro de um alto nível de especialização, *forma specialis* é associada a patogenicidade de apenas uma espécie hospedeira (especialização inter-específica) (SNYDER & HANSEN, 1940). Esta complexidade é o principal obstáculo para a sua identificação. Este patógeno tem sido amplamente relatado no Brasil como agente causal de doenças radiculares no feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e na soja (*Glycine max* (L) Merrill) (KIMATI et al., 1997).

A podridão vermelha da raiz (PVR) era tradicionalmente associada ao fungo *Fusarium solani* f.sp. *glycines*, mas, recentemente, foi determinado que, na América do Sul, essa doença é causada pela espécie *F. tucumaniae* sp. nov., que é filogeneticamente e morfológicamente diferente de *F. virguliforme* sp. nov., causador da doença na América do Norte (AOKI et al., 2003; ARRUDA et al., 2005). A partir das

publicações de 2006 a EMBRAPA apresenta *Fusarium tucumaniae* como agente causal da podridão vermelha da raiz (PVR) (EMBRAPA, 2006).

Segundo AOKI et al. (2005), a PVR na América do Sul é causada por quatro espécies de *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae* e *F. virguliforme*. Sendo que no Brasil, recentemente, além do *F. tucumaniae*, duas novas espécies foram formalmente descritas como causando PVR em soja, *F. brasiliense* e *F. cuneirostrum*. Além disso, AOKI et al. (2005), revelam que a morfologia de conídios permite identificar as quatro espécies de *Fusarium*.

Fusarium virguliforme sp. nov, formalmente conhecido como *F. solani* f. sp. *glycines*, é descrito e ilustrado como agente causal da PVR na América do Norte, e *F. tucumaniae* sp. nov. é apresentado como agente causal da PVR na América do Sul. Os resultados de estudos moleculares evidenciaram ser possível a alteração de nomenclatura em que se utiliza *formae specialis*.

AOKI et al. (2003), descrevem as características morfológicas de conídios e conidióforos que distinguem *F. tucumaniae* de outras espécies dentro do complexo de *F. solani*, tais como *F. virguliforme* e *F. phaseoli*.

Diante das alterações efetuadas recentemente na classificação de *Fusarium* e na descrição de novas espécies relacionadas a PVR, nos próximos parágrafos, será mantida a nomenclatura utilizada pelos autores dos trabalhos apresentados.

F. solani f. sp. *glycines* cresce vagarosamente em meio de batata-dextrose-ágar (BDA), produzindo uma massa azulada de micélio, com grande quantidade de macroconídios (30-65 x 6-8 µm) com 3 a 5 septos e pouca ou nenhuma presença de microconídios (RUPE et al., 1989). Como exemplo, têm-se que colônias em meio de BDA aumentaram 24mm após 7 dias a 25°C (ROY, 1997a).

A existência de diferentes raças do patógeno causador da PVR tem sido motivo de intensa especulação, porém, ainda não há evidências convincentes da sua ocorrência. ACHENBACH et al. (1996), utilizando marcadores RAPD, encontraram 100% de similaridade genética entre 22 isolados causadores da PVR procedentes de várias regiões dos Estados Unidos. Da mesma forma, ACHENBACH et al. (1997) concluíram que os isolados causadores da PVR coletados nos Estados Unidos

compreendiam uma população quase clonal, com nível extremamente baixo de variação genética entre os indivíduos. No Brasil, COSTA & YORINORI (1996) observaram variações morfológicas e de esporulação entre diferentes isolados, mas testes de inoculação não demonstraram diferenças na patogenicidade entre as formas variantes. Por outro lado, tem sido constatada variação na agressividade entre diferentes isolados (MELGAR & ROY, 1994; GRAY & ACHENBACH, 1996; HUANG & HARTMAN, 1998; GÁSPERI, 2000; SCANDIANI et al., 2002). Desta forma, torna-se importante a definição adequada do isolado a ser utilizado em inoculações artificiais para avaliar a reação de cultivares de soja a PVR.

Os conídios de *F. solani* f. sp. *glycines* são disseminados pela água, e sobrevivem por pouco tempo no solo. Os conídios no solo são convertidos em clamidosporos em poucos dias (Park 1956 citado por MEYERS & COOK, 1972).

Estruturas de resistência na forma de clamidosporos, localizadas no solo ou em restos culturais, constituem o inóculo primário da doença (ROY et al., 1997). O modo de penetração do fungo nas raízes ainda não foi bem esclarecido mas, provavelmente, seja de forma direta, isto é, a penetração ocorreria durante a germinação de clamidosporos ou de macroconídios que entram em contato com o sistema radicular das plantas (FRONZA, 2003). Nas raízes, o sintoma primário de infecção da doença é uma mancha avermelhada, mais visível na raiz principal, geralmente localizada um a dois centímetros abaixo do nível do solo. Essa mancha se expande, circunda a raiz e passa da coloração vermelho-arroxeadada para castanho-avermelhada a quase negra (YORINORI et al., 1993). Essa necrose acentuada localiza-se mais no tecido cortical, enquanto que o lenho da raiz adquire coloração no máximo, castanho-clara, que se estende pelo tecido lenhoso da haste atingindo vários centímetros acima do nível do solo. Sob condições de alta umidade, forma-se um anel vermelho na base da haste, freqüentemente, com uma cobertura de coloração bege, constituída de conídios do fungo. Nessa fase, observa-se, na parte aérea, o amarelecimento prematuro das folhas e, com maior freqüência, uma acentuada necrose entre as nervuras das folhas, resultando no sintoma conhecido como “folha carijó”. As raízes secundárias degradam-se rapidamente, ficando apenas a raiz principal. Sob condições de solo úmido o córtex

da raiz principal destaca-se com facilidade, expondo seu lenho de cor clara (ALMEIDA et al., 1997; EMBRAPA, 2001; DOENÇAS da Soja, 2004). Tanto as raízes de cultivares suscetíveis quanto aquelas de cultivares resistentes são infectadas pelo patógeno, porém, a taxa de infecção e o desenvolvimento dos sintomas foram menores nos genótipos resistentes (NJITI et al., 1997a). No final do ciclo de plantas severamente infectadas, é possível se observar uma massa de macroconídios azuis a verde-azulados nas raízes, próximo à superfície do solo, principalmente nos períodos com elevado teor de umidade (ROY et al., 1997).

Os sintomas foliares a campo geralmente se desenvolvem durante ou logo após o florescimento. Nas folhas observam-se manchas circulares a irregulares, espalhadas, internervalmente, de cor verde-pálidas, com uns poucos milímetros ou mais em diâmetro, que produzem um aspecto mosqueado. As manchas podem aumentar, e tornarem-se necrosadas, coalescerem, e formarem regiões alongadas de clorose internerval; podendo também ocorrer completo desfolhamento quando a doença for severa. Além disso, infecção severa durante o florescimento e formação de vagens, geralmente resulta no aborto das flores e das vagens (HIRREL, 1983; RUPE, 1989; RUPE et al., 1989; ROY et al., 1991). A altura das plantas parece não ser afetada pela SMS (HERSHMAN et al., 1990; MELGAR et al., 1994). Entretanto, reduções da altura ocorreram (MCLEAN & LAWRENCE, 1993) em plantas inoculadas artificialmente em casa de vegetação (ROY et al., 1989; RUPE, 1989). As perdas em termos de rendimento de grãos, basicamente, são devidas à redução no número de vagens com sementes e no peso das sementes (NJITI et al., 1998; GÁSPERI, 2000).

Condições de alta umidade do solo (cerca de -0,003 a -0,01MPa) e temperaturas amenas foram favoráveis ao desenvolvimento da doença, sendo que temperaturas em torno de 15°C favoreceram o desenvolvimento dos sintomas nas raízes e, entre 22 a 24°C, na parte aérea (SCHERM & YANG, 1996). Assim, áreas irrigadas ou com maior altitude parecem ser mais sujeitas à incidência da doença (FRONZA, 2003). O efeito da temperatura também é importante para a germinação dos macroconídios, que não ocorre a 4°C e é maior a 25°C do que a 20 ou 30°C (LI et al., 1998). Embora vários fatores químicos e físicos do solo estejam associados com a incidência da PVR,

freqüentemente, tem-se observado que a doença é mais severa nas áreas mais produtivas (RUPE, 1999).

1.4. Métodos para identificação da reação de cultivares de soja a PVR

Por ser causada por um fungo de solo e pela expressão dos sintomas ser influenciada pelas condições edáficas e climáticas, muitos pesquisadores têm avaliado a reação de genótipos a PVR no próprio campo, instalando experimentos em diversos locais. Outros, porém, têm utilizado diversas metodologias de inoculação artificial e avaliação dos sintomas em ambientes controlados. No entanto, uma metodologia precisa e segura ainda não foi desenvolvida, havendo controvérsias na indicação do método mais adequado para avaliação em programas de melhoramento visando desenvolver cultivares mais resistentes a PVR (FRONZA, 2003).

Em casa de vegetação ou câmaras de crescimento, a principal diferença entre os métodos de avaliação é a forma de se proceder a inoculação artificial, sendo os métodos encontrados na literatura os seguintes:

- a)** Grãos de aveia colonizados (LIM, 1991; STEPHENS et al., 1993a; 1993b e 1993c; MELGAR & ROY, 1994; TORTO et al., 1996; NELSON et al., 1997);
- b)** Grãos de sorgo colonizados (RINGLER & NICKELL, 1996; HARTMAN et al., 1997; HUANG & HARTMAN, 1998; BALARDIN & RUBIN, 1999);
- c)** Micélio em palito de dente (MELGAR & ROY, 1994; COSTA & YORINORI, 1995a e 1995b; LEÃO et al., 1998; KLINGELFUSS et al., 2001a e 2001b; KLINGELFUSS et al., 2002);
- d)** Suspensão de micélio/conídios (COSTA & YORINORI, 1995a; HEAVNER et al., 1996);
- e)** Farinha de milho (fubá) e areia (KILLEBREW et al., 1988; ROY et al., 1989; MCLEAN & LAWRENCE, 1993; TORTO et al., 1996; NJITI et al., 1997a e 1997b);
- f)** Imersão das raízes em suspensão de conídios (COSTA & YORINORI, 1995a).

O uso de grãos de sorgo colonizados para se proceder à inoculação durante a semeadura tem reduzido a variabilidade dos resultados, tornando possível a realização de análises de rotina em casa de vegetação, porém, é imprescindível que as sementes de soja não fiquem em contato direto com o inóculo, porque a podridão radicular excessiva impede o crescimento suficiente das plantas para permitir o desenvolvimento de sintomas foliares típicos da PVR (RUPE, 1999). Desta forma, este é o método que se apresenta como o mais promissor para a avaliação de genótipos, utilizando-se inoculação artificial. Este método é uma modificação daquele que utiliza grãos de aveia (LIM, 1991), procedendo-se à inoculação das plântulas aos 20 dias após a semeadura (estádio V2), com dois grãos de sorgo/plântula, colocados cerca de 2 cm abaixo da superfície do solo, próximo da raiz principal, com o auxílio de uma faca (para abrir uma fenda no solo) ou de uma colher (para escavar o solo), tomando-se o cuidado para não atingir as raízes e de cobrir os grãos de sorgo com o solo (RINGLER & NICKELL, 1996). HARTMAN et al. (1997) e HUANG & HARTMAN (1998) também apresentaram detalhes desta metodologia, só que procederam à inoculação durante a semeadura, realizada em bandejas (8x12 cm), colocando 5 cm³ de grãos de sorgo colonizados com o patógeno em 12 cm de sulco (com 2 cm de profundidade e espaçamento entre sulcos de 3 cm), e após adicionaram 800 cm³ de solo. Em vez de colocar o inóculo em sulcos, BALARDIN & RUBIN (1999) utilizaram seis grãos de sorgo para cada semente de soja ou cova, colocando-as 2 cm abaixo das sementes no momento da semeadura. Posteriormente FRONZA (2003) utilizou apenas três grãos de sorgo por cova, mas sugeriu que fossem utilizados cinco grãos, para garantir quantidade suficiente de inóculo e que as raízes entrem em contato com o patógeno.

Estudos em casa de vegetação e de campo, têm demonstrado diferenças de reação entre cultivares, porém, testes mais rigorosos de campo têm sido dificultados pelas variações climáticas de cada safra (YORINORI, 2000b). O uso de cultivares resistentes e medidas para evitar a compactação do solo que predispõe as plantas ao estresse hídrico e ao encharcamento do solo também podem controlar a PVR (ALMEIDA et al., 1997).

Trabalhos de avaliação da reação de genótipos de soja foram conduzidos por alguns pesquisadores brasileiros (YORINORI & NOMURA, 1994; COSTA & YORINORI, 1995b). Esses trabalhos foram realizados com inoculação de plantas pelo método palito de dente, sendo a avaliação da reação efetuada através da severidade dos sintomas foliares ou do comprimento de lesão no caule. Apesar da avaliação da reação de cultivares segundo os sintomas foliares ser rápida e relativamente eficiente, alguns autores relataram falta de correlação entre sintomas nas raízes e na parte aérea (GRAY & ACHENBACH, 1996; SCHERM & YANG, 1996; HARTMAN et al., 1997). Existem alguns relatos sobre a reação de cultivares de soja a *F. solani* f. sp. *glycines*, porém são informações, que muitas vezes mostram o comportamento instável de determinadas cultivares quanto a PVR (RUPE et al., 1991; NJITI et al., 1996; GÁSPERI et al., 2003). A presença de interação genótipos x ambientes significativa também foi constatada por RUPE & GBUR (1995) e NJITI et al. (1996 e 1997a).

No Brasil, inoculações artificiais e/ou observações a campo apresentaram as seguintes cultivares como mais tolerantes à PVR (SMS): BR-4, BR-6 (Nova Bragg), BR-9 (Savana), CAC-1, EMBRAPA-1 (IAS 5-RC), EMBRAPA-9 (Bays), EMGOPA-315 (Rio Vermelho), FT-5 (Formosa), FT-7 (Tarobá), FT-9 (Inaê), FT-10 (Princesa), FT-14 (Piracema), FT-20 (Jaú), FT-Cometa, FT-Guaíra, FT-Jatobá, IAC-13, IAC-15, KI-S 601, KI-S 602 RCH, MG/BR-46 (Conquista), MT/BR-49 (Pioneira) e OCEPAR-4 (Iguaçu). Entretanto, as reações dessas cultivares necessitam ser reavaliadas sob condições ótimas para ocorrência da doença (EMBRAPA, 2001). A cultivar IAC-4 foi considerada altamente resistente em avaliações a campo (YORINORI et al., 1993).

Comparando-se a reação de cinco cultivares (FT-104, FT-Cristalina RCH, FT-Estrela, EMGOPA 315 e CAC-1) pelo método do palito de dente, LEÃO et al. (1998) verificaram que CAC-1 e FT-104 foram as mais resistentes a PVR, enquanto que FT-Estrela e FT-Cristalina foram as mais suscetíveis, e EMGOPA 315 apresentou reação intermediária.

KLINGELFUSS et al. (2001a), efetuando a inoculação pelo método do palito de dente, compararam cinco cultivares (Ripley, Canário, BRS Milena, Paiaguás e Conquista) e duas PI's (520.733 e 567.374), todas tidas como resistentes a PVR, com a

cultivar suscetível FT-Estrela, e concluíram que as PI's 520.733 e 567.374 e as cultivares Conquista e Canário foram as mais resistentes, sendo indicadas para utilização em cruzamentos visando resistência a PVR, enquanto a cultivar Estrela demonstrou ser um bom padrão de suscetibilidade.

Avaliando métodos de inoculação para quantificação de resistência em soja a *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, em casa de vegetação, KLINGELFUSS et al. (2007) apresentaram que as inoculações com grãos de sorgo e milho colonizados pelo patógeno foram mais eficientes em causar a doença; e que a cultivar FT-Estrela apresentou reação de suscetibilidade, confirmando seu uso como padrão suscetível.

Em três experimentos conduzidos no campo num mesmo local, envolvendo 91 genótipos, principalmente novas linhagens, FARIAS NETO et al. (2001) observaram que as cultivares EMGOPA 302, EMGOPA 316, Milena e Conquista se destacaram pela sua resistência, havendo também linhagens superiores que poderiam servir como fontes de resistência a PVR.

Utilizando dois métodos de inoculação (palito de dente e suspensão de micélio + esporos), em experimentos diferentes, YORINORI & NOMURA (1994) avaliaram 177 cultivares brasileiras, encontrando como resistentes as cultivares BR-27 (Cariri), FT-5 (Formosa), FT-15, FT-Jatobá e Paranagoiana e, como moderadamente resistentes, as cultivares BR-4, CAC-1, FT-8 (Araucária), IAC-2, IAC-4, MT/BR-45 (Paiaguás), OCEPAR-4 (Iguaçu), OCEPAR-9 (SS-1) e UFV-9 (Sucupira).

GÁSPERI (2000) comparou os métodos do palito de dente e dos grãos de sorgo, avaliando os sintomas na parte aérea e no sistema radicular, respectivamente, e observou variação entre os dois métodos na reação das 30 cultivares testadas: BRS 137, BRS 138 e EMBRAPA 66 foram as mais resistentes no teste do palito, enquanto que no método dos grãos de sorgo, IAS 5 e BRS 137 foram as mais resistentes. O autor também concluiu que não houve correlação entre a expressão dos sintomas na parte aérea e nas raízes, demonstrando que os mecanismos de resistência envolvidos, possivelmente, sejam diferentes.

A exemplo de outras doenças do sistema radicular, ainda não estão disponíveis formas eficientes de controle da PVR. Entre as possíveis táticas de controle da doença

pesquisadas atualmente, a seleção de cultivares resistentes é apontada como a mais promissora (RUPE et al., 1991). Além disso, é importante salientar que ainda não foi encontrado genótipo imune ao ataque do patógeno causador da PVR, então, mesmo cultivares consideradas resistentes irão apresentar algum sintoma da doença, pelo menos nas raízes. Assim, é fundamental que se inclua nos programas de melhoramento genético, a seleção de genótipos resistentes a essa doença.

1.5. O método da folha destacada

A cultura da folha destacada, definida como a manutenção de folhas vivas por um certo período após ter sido destacada da planta mãe (YARWOOD, 1946; TUIE, 1969) é uma técnica que apresenta vantagens quanto à economia de espaço, de material vegetal e de inóculo; facilidade de controle e manipulação de fatores ambientais; redução na contaminação; uniformidade experimental; facilidade e exatidão nas observações, uma vez que, se pode examinar o material sob microscópio sem prejudicar a cultura; eliminação quanto à necessidade de luz quando o cultivo é feito em solução de sacarose; crescimento exuberante de alguns parasitas obrigatórios como ferrugem e oídios (YARWOOD, 1946; HOOKER & YARWOOD, 1966; TUIE, 1969; HENESSY & SACKSTON, 1970; MIGNUCCI, 1978). Esta técnica foi inicialmente utilizada em estudos de fisiologia vegetal, como absorção de água, transpiração, respiração e fotossíntese. Após alguns anos de sua descoberta, os fitopatologistas começaram a utilizá-la para testes de inoculação e estudos de fisiologia de parasitismo (YARWOOD, 1946), sendo desenvolvida ao longo do tempo, através de diferentes métodos. Todos os métodos desenvolvidos possuem uma característica em comum, a simplicidade. Um dos métodos mais simples consiste em acondicionar as folhas em placas de Petri contendo uma camada de algodão recoberta com papel de filtro umedecido (MIGNUCCI, 1978; CENTURION & KIMATI, 1994; CENTURION et al., 1994).

Por ser simples e apresentar inúmeras vantagens, a técnica da folha destacada é empregada principalmente para estudos do desenvolvimento de parasitas obrigatórios como *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* e *Microsphaera diffusa* (BRODWER, 1964; MIGNUCCI, 1978); para estudos das relações patógeno-hospedeiro, especialmente nos casos de ferrugens (HOOKER & YARWOOD, 1966; HENESSY & SACKSTON, 1970; LUMBROSO et al., 1977); para a seleção de microrganismos antagônicos à ferrugem do feijoeiro (CENTURION & KIMATI, 1994, CENTURION et al., 1994); e para a determinação da resistência de diferentes genótipos nas combinações trigo/*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, alfafa/*Phoma herbarum* var. *medicaginis*, amendoim/*Puccinia arachidis* (WARD, 1959; WILCOXSON et al., 1974; MORAES & SAVY FILHO, 1983), soja/*M. diffusa* (CENTURION et al., 2000; CENTURION et al., 2001). Mais recentemente, FRANCO (2004) testou a viabilidade da técnica da folha destacada para determinação da reação de genótipos de soja à SMS, e obteve resultados que evidenciaram que *F. solani* f. sp. *glycines* infecta a folha destacada enraizada inoculada pelo método do palito de dente, provocando morte do pecíolo e amarelecimento gradual da folha a partir da base. Entretanto, o método do palito de dente nem sempre permitiu a caracterização de cultivares resistentes. O autor concluiu que o emprego da técnica da folha destacada poderá ser promissor nos estudos de determinação de reações de genótipos de soja à *F. solani* f. sp. *glycines* com ajustes de metodologia.

CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE *F. tucumaniae* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

RESUMO - O presente trabalho objetivou avaliar a esporulação de *F. tucumaniae* em meios de cultura de grãos de sorgo e grãos de aveia, incubados em diferentes luminosidades. Utilizaram-se erlenmeyers de 250 mL, onde foram colocados 100 cm³ de grãos de sorgo ou de grãos de aveia, previamente embebidos em água por cerca de 12 horas, sendo a água restante eliminada após esse período. Os erlenmeyers foram autoclavados por duas vezes, durante 20 minutos a 120°C, com intervalo de 24 horas. Após o resfriamento, para cada erlenmeyer foram transferidos 15 discos, de 5 mm de diâmetro, de colônias do fungo em BDA. Em seguida, foram adicionados 10 mL de água destilada esterelizada. Os erlenmeyers foram incubados em câmara de germinação a 24°C, no claro e no escuro e, agitados periodicamente. Realizaram-se 10 repetições, sendo cinco utilizadas na 1ª avaliação (15 dias após a repicagem) e cinco na 2ª avaliação (30 dias após a repicagem). Para isto, prepararam-se suspensões de conídios para contagem em hemocitômetro. Os resultados aos 15 dias evidenciaram maior esporulação do fungo em grãos de sorgo, não havendo diferenças significativas entre as luminosidades. Aos 30 dias, grãos de sorgo no claro promoveram esporulação superior aos demais tratamentos.

Palavras-Chave: esporulação, *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, meios de cultura

INTRODUÇÃO

Para estudar a taxonomia das espécies de *Fusarium* torna-se necessário a adoção de procedimentos básicos apropriados que incluem o uso de meios de cultura e condições de cultivo específicos, devendo ser observado a forma dos macroconídios, forma e modo de produção dos microconídios e formação de clamidósporos (presença ou ausência) (Burgess et al., 1994; Nelson et al., 1983 citados por VENTURA, 1999).

A pigmentação e morfologia da colônia de *F. solani* f. sp. *glycines* são as mesmas nos meios BDA (batata-dextrose-ágar) e BDASA (batata-dextrose-ágar com estreptomicina e aureomicina) (ROY, 1997a; ROY, 1997b). A pigmentação azul que se associou ao agente causal da SMS (ROY et al., 1989; ROY et al., 1997; ROY, 1997a) é invariavelmente produzida por culturas jovens do *F. solani* f. sp. *glycines*. No entanto, as colônias exibem consideráveis variações na pigmentação superficial devido a grande quantidade de esporulação. Massas pequenas de macroconídios azuis à verde azulados são produzidos em esporodóquios distintos e espalhados. Quando observados microscopicamente (x 100), os conídios variam de azul avermelhados a azul escuros. Isolados com graus variáveis de esporulação formam colônias com variável pigmentação azul. Em alguns isolados esporulados profusamente, as massas conidiais verde azuladas ocupam quase toda a superfície da colônia, exceto na extremidade branco acinzentada de hifas não esporuladas. A massa conidial radiante para fora do centro da colônia é geralmente contínua, mas pequenos grupos espalhados de esporodóquios às vezes aparecem. Massas conidiais coloridas, pequenas e espalhadas, às vezes ocorrem na parte central mais velha da colônia. Massas de esporo violeta, roxa e azul escura tendem a se formar e tornarem-se misturadas com as massas de esporo azul a verde azulada a medida que as colônias envelhecem. As massas de esporos violeta ou roxa às vezes ocorrem como setores radiantes do centro da colônia, particularmente com subculturas freqüentes (ROY et al., 1997).

F. solani f. sp. *glycines* raramente produz microconídios (ROY et al., 1989; ROY et al., 1997; RUPE, 1989). Forma o macroconídio em conidióforos simples ou

ramificados (ROY et al., 1989; ROY et al., 1997). Os macroconídios são predominantemente divididos em três septos, mas conídios de quatro septos são numerosos e os esporos com cinco ou mais septos ocorrem (ROY et al., 1989; ROY et al., 1997; RUPE, 1989). Um ou mais clamidósporos podem ser formados no macroconídio individual ou podem ser formados em pares ou unidades, tanto na parte terminal quanto intercaladamente na hifa (MELGAR et al., 1994; ROY et al., 1989; ROY et al., 1997).

O papel do clamidósporo no ciclo de vida do *Fusarium solani* (Mart.) Appel & Wr. e outras espécies de *Fusarium* está bem estabelecido. Os conídios são disseminados pela água espalhada da planta na superfície do solo, mas são de pequeno valor de sobrevivência no solo. Os conídios no solo são convertidos em clamidósporos em poucos dias. Os fatores responsáveis pela conversão dos conídios em clamidósporos são pouco conhecidos (Park 1956 citado por MEYERS & COOK, 1972).

Fusarium solani f. sp. *glycines* cresce vagorosamente em meio de batata-dextrose-água (BDA), como exemplo, temos que colônias em meio de BDA aumentaram 24mm após 7dias a 25°C, à temperatura ótima para o crescimento do patógeno neste meio (ROY, 1997a).

Diante das alterações de nomenclatura de *Fusarium solani* f. sp. *glycines* para *Fusarium tucumaniae*, foi efetuada nova descrição morfológica do fungo que atualmente, no Brasil, é relacionado à PVR (AOKI et al., 2003).

Como as primeiras tentativas de cultivo do patógeno evidenciaram alta exigência e alta variabilidade, foi instalado um ensaio com objetivo de verificar o efeito de dois meios de cultura (grãos de sorgo e grãos de aveia) incubados em câmara de germinação a 24°C, no claro e no escuro, sobre a esporulação do fungo.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Obtenção e manutenção do inóculo

O isolado de *Fusarium tucumaniae* é procedente do Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas, ESALQ/USP/Piracicaba. O isolado foi identificado como SDS – 5, e é considerado o mais patogênico já coletado no Brasil pela equipe da Embrapa Soja (FRONZA, 2003).

O isolado foi mantido através de transferências sucessivas para tubos de ensaio e placas de Petri contendo meio de BDA (1L água destilada, 200 g/L de batata, 20 g de dextrose e 20 g ágar), e foram incubados em câmaras de germinação, à temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, e/ou geladeira, a cerca de 5°C .

2. Avaliação do desenvolvimento de *F. tucumaniae* em diferentes meios de cultura

Discos de colônias de *F. tucumaniae* em BDA foram transferidos para meios de grãos de sorgo e de grãos de aveia. Este procedimento foi semelhante ao proposto por LIM (1991), que utilizou grãos de aveia, seguindo-se as modificações efetuadas por HARTMAN et al. (1997) e BALARDIN & RUBIN (1999), que utilizaram grãos de sorgo. Foram utilizados erlenmeyers de 250 mL, onde foram colocados cerca de 100 cm^3 de grãos de sorgo ou grãos de aveia previamente embebidos em água. A embebição foi efetuada por 12 horas. No dia seguinte, a água restante foi eliminada e os frascos contendo as sementes previamente embebidas foram autoclavados duas vezes, durante 20 minutos a 120°C , com intervalo de 24 horas. Após o resfriamento, para cada erlenmeyer foram transferidos 15 discos, de 5 mm de diâmetro, de colônias do fungo em BDA. Em seguida, foram adicionados 10 mL de água destilada estéril com auxílio de uma seringa de vidro previamente autoclavada, para promover melhor espalhamento dos esporos e micélio, e o umedecimento dos grãos de sorgo e de aveia. Para promover o crescimento uniforme do micélio do fungo em torno dos grãos de sorgo e de aveia, e para manter os grãos soltos, os frascos foram agitados periodicamente. Os frascos foram incubados em câmara de germinação a 24°C , no claro e no escuro.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, sendo testados quatro tratamentos (grãos de aveia mantidos no claro e no escuro, e grãos de sorgo mantidos no claro e no escuro, ambos incubados a 24°C) com 10 repetições.

Realizaram-se avaliações aos 15 e 30 dias, sendo utilizadas cinco repetições na 1ª avaliação e cinco na 2ª avaliação. Para isto foram adicionados 100 mL de água destilada aos erlenmeyers, com posterior agitação manual. A suspensão resultante foi filtrada em gaze para, posteriormente, ser submetida a contagem de conídios em hemocitômetro.

3. Análises estatísticas dos resultados

Os resultados obtidos foram submetidos a análises de variância pelo teste F, utilizando-se o esquema fatorial 2 x 2 (dois meios (grãos de sorgo e de aveia) e duas luminosidades (claro e escuro)), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Avaliação do desenvolvimento de *F. tucumaniae* em diferentes meios de cultura

Na Tabela 1 estão os resultados da esporulação de *F. tucumaniae* em meios de cultura e ambientes diferentes, aos 15 e 30 dias após a repicagem do fungo. Observou-se pelos resultados obtidos aos 15 dias após repicagem, maior esporulação do fungo em grãos de sorgo, não havendo diferenças significativas entre as luminosidades. Aos 30 dias após a repicagem observou-se efeito significativo entre meios e entre luminosidades, e os resultados evidenciaram que culturas em grãos de sorgo, incubadas no claro foram favorecidas no que se refere a esporulação do fungo em relação aos demais tratamentos. ALVES et al. (2002), em estudo de esporulação de *Fusarium* sp. em substratos naturais e sintéticos para a produção massal desse micoherbicida, chegaram ao resultado de maior produção de esporos nos substratos naturais, destacando-se o de grãos de sorgo com $1,2 \times 10^7$ esporos/mL.

Tabela 1. Número médio de esporos de *Fusarium tucumaniae* em diferentes meios de cultura e ambientes, aos 15 e 30 dias após a repicagem do fungo.

Meio de Cultura (MC)	Nº de esporos x 10 ⁴ /mL (15 dias)	Nº de esporos x 10 ⁴ /mL (30 dias)
Sorgo	575,01a ⁽¹⁾	258,25a
Aveia	106,25b	10,50b
Teste F ⁽²⁾	17,10**	31,21**
dms (5%)	1,72	1,29
Ambiente (A)		
Escuro	236,90a	31,71b
Claro	444,40a	237,04a
Teste F ⁽²⁾	2,32 ^{NS}	5,44**
dms (5%)	1,72	1,29
Teste F MC x A	0,85 ^{NS}	4,29 ^{NS}
C.V. (%)	42,15	44,07

⁽¹⁾Médias (de 5 repetições/tratamento) em escala original, seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

⁽²⁾Análise de variância efetuada com resultados transformados em log (x+1).

Na Figura 1 está ilustrado o aspecto de uma das colônias de *F. tucumaniae* em BDA utilizada para transferir os 15 discos para cada erlenmeyer.

Na Figura 2 pode-se observar o crescimento, e aspectos morfológicos das colônias de *Fusarium tucumaniae* nos meios de grão de sorgo e de aveia, mantidos no claro e escuro, aos 15 dias após a repicagem e transferência do fungo. Pela Figura 3, aos 15 dias, pode-se observar a menor quantidade de micélio que aos 30 dias após a repicagem.



Figura 1. Aspecto da colônia de *Fusarium tucumaniae* utilizada para transferência de discos para os erlenmeyers.

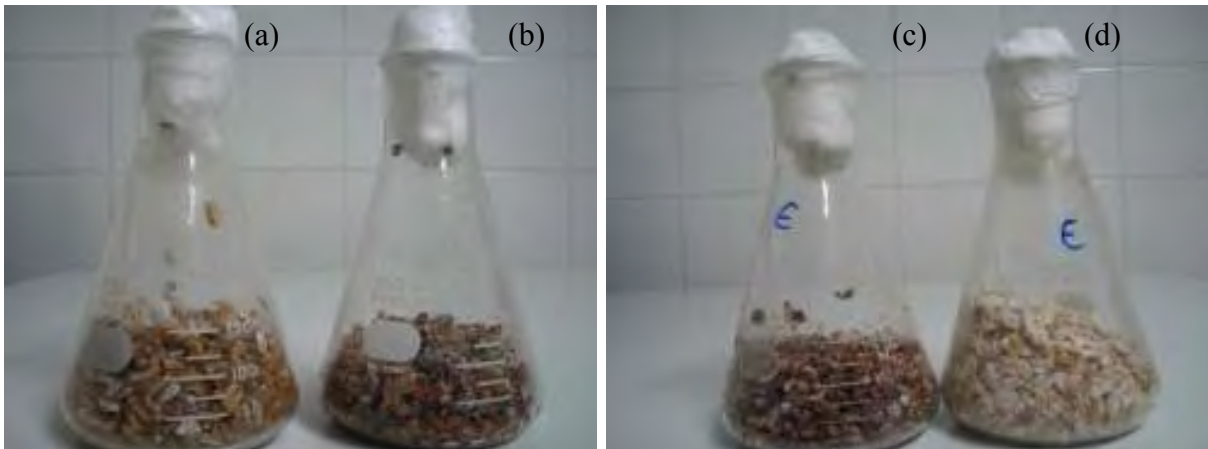


Figura 2. Aspecto das culturas de *Fusarium tucumaniae*, em meios de grãos de aveia (a), e grãos de sorgo (b), mantidos no claro, e de grãos de sorgo (c) e de aveia (d) mantidos no escuro, 15 dias após a repicagem.

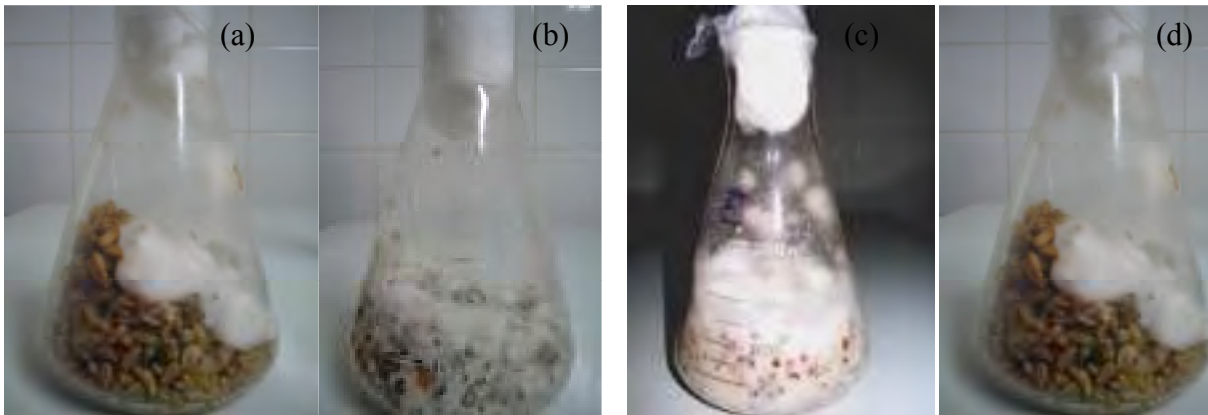


Figura 3. Aspecto das culturas de *Fusarium tucumaniae*, em meios de grãos de aveia (a), e de grãos de sorgo (b), mantidos no claro, e de grãos de sorgo (c) e de aveia (d) mantidos no escuro, 30 dias após a repicagem.

Atualmente, caracterizações morfológicas e moleculares de espécies de *Fusarium* que causam a SMS têm sido realizadas (TAYLOR et al., 2000; O'DONNELL, 2000; AOKI et al., 2003; AOKI et al., 2004; AOKI et al., 2005; ARRUDA et al., 2005).

Segundo ARRUDA et al. (2005), características culturais e morfológicas são inadequadas para identificação clara do agente causal da PVR, por causa da sua ampla variabilidade e instabilidade por longos períodos em meio de cultura. Alguns autores (ROY et al., 1989, RUPE, 1989) sempre notaram tais mudanças após longos períodos em meio de cultura, incluindo redução de esporulação, alteração na cor das colônias e aumento da densidade de micélio aéreo (micélio esbranquiçado).

De acordo com COSTA e YORINORI (1996), isolados deste fungo mantidos em laboratório, tem variado quanto à morfologia e à capacidade de esporulação em sucessivas repicagens, variando de intensa esporulação azul e crescimento micelial fraco a colônias com pouca esporulação e abundante micélio esbranquiçado. Variações dessa natureza foram observadas no presente trabalho, mesmo quando se compara a morfologia das colônias num mesmo meio de cultura e mesmas condições de ambiente. Aos 15 dias após a repicagem, o fungo apresentou colônias diferentes quando comparado com o fungo aos 30 dias. A medida que envelheceram as colônias ficaram brancas, com aspecto cotonoso, devido à presença de micélio. Outro aspecto foi a dificuldade em agitar os erlenmeyers aos 30 dias, pois os meios se tornaram duros.

FRANCO (2004) observou o crescimento lento de *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, independente do meio de cultura e da temperatura de incubação atingindo, no máximo, aproximadamente 8 cm de diâmetro aos 28 dias após a repicagem. ROY et al.(1997a) também relataram o crescimento lento do patógeno.

CONCLUSÕES

Grãos de sorgo mantidos no claro promoveram esporulação superior de *Fusarium tucumaniae* quando comparados aos demais tratamentos testados.

CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *Fusarium tucumaniae* EM FOLHAS DESTACADAS E EM PLÂNTULAS DE SOJA CULTIVADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO NO OUTONO/INVERNO-2005 E PRIMAVERA/VERÃO-2005/2006

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi estudar metodologias de inoculação de *Fusarium tucumaniae* em plântulas de soja e em folhas destacadas. Plântulas das cultivares CAC-1(R), MG/BR 46(Conquista) (R), FT-Estrela (S) e FT-Cristalina (S), foram cultivadas no outono/inverno 2005 e primavera/verão 2005/2006 e folhas destacadas, acondicionadas em solo e papel de filtro e, incubadas em câmaras de germinação com temperaturas ajustadas para 15°C e 23°C e fotoperíodo de 12 h, também foram feitas. A inoculação foi realizada através de quatro métodos: 1) método do palito de dente; 2) método do disco de colônia; 3) método de grãos de sorgo colonizados com o patógeno e 4) método de grãos de aveia colonizados com o patógeno. A avaliação dos sintomas em plântulas foi efetuada semanalmente após 15 dias da inoculação, através de duas escalas de notas. Avaliações de altura de plantas, massa seca de raiz e nível de infecção de raiz foram efetuadas. As metodologias de inoculação mostraram-se promissoras na época de outono/inverno 2005, pois houve infecção das plântulas, principalmente das variedades suscetíveis, e os sintomas típicos da doença ocorreram em todos os métodos utilizados. Plântulas de FT-Cristalina apresentaram maior nível de infecção quando utilizou-se o método de grãos de sorgo, no outono/inverno 2005. Na primavera/verão 2005/2006 não ocorreu evolução da doença, e poucos sintomas foliares foram visualizados. Foram realizadas três avaliações, empregando-se escala de notas de 0 a 5 para avaliação do nível de infecção (NI) de doenças foliares, no caso de folhas destacadas. O método de inoculação com grãos de aveia, aos 30 dias após a inoculação, promoveu maior infecção nas folhas destacadas. O ambiente mais propício ao desenvolvimento dos sintomas da doença em folhas destacadas foi o solo a 23°C.

Palavras- chave: *Glicine max* (L.) Merrill, *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, SMS, PVR

INTRODUÇÃO

Uma doença que atualmente tem merecido atenção dos fitopatologistas e melhoristas, é a síndrome da morte súbita (SMS) ou podridão vermelha da raiz (PVR), por causar severas perdas na produção de soja nas Américas do Norte e do Sul. É causado por um fungo de solo, *Fusarium tucumaniae* anteriormente denominado *Fusarium solani* f. sp. *glycines* (AOKI et al., 2003), e a expressão dos sintomas é influenciada pelas condições edáficas e climáticas, o que dificulta a avaliação da reação de variedades de soja a esta doença.

Trabalhos de avaliação da reação de genótipos de soja a *Fusarium solani* f. sp. *glycines* foram conduzidos por alguns pesquisadores brasileiros (YORINORI & NOMURA, 1994; COSTA & YORINORI, 1995b). Esses trabalhos foram realizados com inoculação de plantas pelo método palito de dente e avaliação da reação através da severidade dos sintomas foliares ou do comprimento de lesão no caule. Apesar da avaliação da reação de cultivares segundo os sintomas foliares ser rápida e relativamente eficiente, alguns autores relataram falta de correlação entre sintomas nas raízes e na parte aérea (GRAY & ACHENBACH, 1996; SCHERM & YANG, 1996; HARTMAN et al., 1997). Existem alguns relatos sobre a reação de cultivares de soja a *F. solani*, porém são informações, que muitas vezes mostram o comportamento instável de determinadas cultivares quanto a PVR (RUPE et al., 1991; NJITI et al., 1996; GÁSPERI et al., 2003). A presença de interação genótipos x ambientes significativa também foi constatada por RUPE & GBUR (1995) e NJITI et al. (1996 e 1997a)

A exemplo de outras doenças do sistema radicular, ainda não estão disponíveis formas eficientes de controle da PVR. Entre as possíveis táticas de controle da doença pesquisadas, a seleção de cultivares resistentes é apontada como a mais promissora (RUPE et al., 1991). É fundamental que se inclua nos programas de melhoramento genético, a seleção de genótipos resistentes a essa doença. Porém, uma metodologia precisa e segura ainda não foi desenvolvida, havendo controvérsias na indicação do método mais adequado para avaliação de genótipos de soja nos programas de melhoramento visando desenvolver cultivares mais resistentes a PVR. Com isso, o

presente estudo objetivou avaliar metodologias alternativas de inoculação artificial de *Fusarium tucumaniae*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Avaliação de diferentes métodos de inoculação em folhas destacadas

Foram utilizadas folhas destacadas preparadas de duas formas (papel de filtro e terra) de cultivares de soja com reações de resistência conhecida, inoculadas através de quatro métodos.

Após inoculação as folhas destacadas foram incubadas em câmaras de germinação com temperaturas ajustadas para 15°C e 23°C e fotoperíodo de 12 h.

As cultivares CAC-1 e MG/BR 46 (Conquista) foram incluídas como resistentes (R) a PVR (EMBRAPA, 2001), e FT-Estrela (KLINGELFUSS et al., 2007) e FT-Cristalina, como suscetíveis (S) à doença (LEÃO et al., 1998).

1.1. Avaliação dos métodos de inoculação em folhas destacadas enraizadas em papel de filtro e em terra

Folhas destacadas de soja cultivada em casa de vegetação foram acondicionadas conforme metodologia utilizada por CENTURION et al. (2000) e CENTURION et al. (2001). Para isso, plântulas de soja no estágio V1 (FHER & CAVINESS, 1977), foram coletadas no final da tarde conforme recomendação de TUIITE (1969). No laboratório, as folhas foram destacadas da planta, cortando-se o pecíolo imerso em água destilada com auxílio de tesoura, sendo em seguida envolvido por algodão embebido em água destilada. Essas folhas destacadas foram colocadas em placas de Petri previamente preparadas com uma camada de algodão recoberta com papel de filtro embebido com água destilada (cerca de 20 mL/placa). Também foram

preparadas folhas destacadas no solo, acondicionando-se as folhas destacadas das plântulas em placas de Petri contendo cerca de 50 mL de solo esterelizado umedecido com 20 mL de água destilada. O pecíolo das folhas neste caso, foi introduzido diretamente no solo.

Uma lâmina de vidro utilizada em microscopia foi colocada sobre o papel de filtro ou solo, para evitar o contato com a superfície úmida do papel de filtro ou do solo. Sob as tampas das placas de Petri foi colocado plástico transparente para evitar a perda de água do solo ou do papel de filtro contido na placa.

Após acondicionadas, as folhas destacadas foram incubadas em câmara de germinação com temperatura ajustada para 24°C e fotoperíodo de 12 h até o enraizamento, sendo então inoculadas e incubadas da seguinte forma:

- **método do palito de dente:** extremidades afiadas de palitos de dente (com cerca de 1 cm de comprimento) lavadas em água destilada, e autoclavadas, foram dispostas em placas de Petri contendo meio de farinha de aveia, simultaneamente à repicagem do patógeno. Após a repicagem do patógeno as placas foram incubadas à temperatura de 28°C, por volta de 10 dias antes da inoculação, para promover o desenvolvimento do patógeno sobre os palitos. Os palitos colonizados foram introduzidos no calo que se forma no pecíolo de onde são emitidas as raízes das folhas destacadas.

- **método do disco de colônia:** dois ou três discos de 0,5 cm de diâmetro de colônia de *F. tucumaniae*, cultivado em meio de farinha de aveia, foram cortados e colocados sobre as folhas, próximos a inserção com o pecíolo.

- **método de grãos de sorgo colonizados com o patógeno:** discos de colônia de *F. tucumaniae* em BDA, foram transferidos para meio de grãos de sorgo. Este procedimento foi semelhante ao proposto por LIM (1991), que utilizou grãos de aveia, seguindo-se as modificações efetuadas por HARTMAN et al. (1997) e BALARDIN & RUBIN (1999), que utilizaram grãos de sorgo. Utilizaram-se erlenmeyers de 250 mL, onde foram colocados cerca de 100 cm³ de grãos de sorgo previamente embebidos em água. A embebição foi efetuada por uma noite (cerca de 12 horas). No dia seguinte, a água restante foi eliminada e os frascos contendo as sementes embebidas foram autoclavados duas vezes, durante 20 minutos a 120°C, com intervalo de 24 horas. Após

o resfriamento, para cada erlenmeyer foram transferidos 15 discos, de 5 mm de diâmetro, de colônias do fungo em BDA. Em seguida, foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada para promover um melhor espalhamento dos esporos e micélio e o umedecimento dos grãos de sorgo. Também visando obter crescimento uniforme do micélio do fungo em torno dos grãos de sorgo e para manter os grãos soltos, os frascos foram agitados manual e periodicamente, conforme necessário (diariamente ou a cada dois a três dias). Os frascos foram incubados em câmara de germinação a 24°C, e fotoperíodo de 12 horas. Na inoculação foram utilizados dois grãos de sorgo, colocados em posição oposta encostados à região do pecíolo das folhas destacadas, com auxílio de uma pinça.

● **método dos grãos de aveia colonizados com o patógeno:** O preparo e a inoculação foram realizados utilizando-se metodologia descrita para grãos de sorgo colonizados, mudando-se apenas o período de embebição dos grãos, que neste caso foi de 2 horas (para evitar amolecimento excessivo do grão).

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo cada parcela constituída por uma placa de Petri contendo duas folhas primárias destacadas de soja.

Foram realizadas três avaliações, aos 15, 22 e 30 dias após a inoculação, empregando-se escala de notas de 0 a 5 proposta por YORINORI (1997a) para avaliação do nível de infecção (NI) de doenças foliares, em que: 0 = sem sintomas; 1 = traços a 10% de área foliar infectada (AFI); 2 = 11 a 25% AFI; 3 = 26 a 50% de AFI; 4 = 51 a 75% AFI; 5 = 76 a 100% AFI.

2. Avaliação de métodos de inoculação em plântulas cultivadas em casa de vegetação

Plântulas das cultivares CAC-1(R), MG/BR 46(Conquista) (R), FT-Estrela (S) e FT-Cristalina (S), cultivadas em vasos plásticos contendo terra, foram inoculadas através dos quatro métodos, descritos a seguir:

● **método do palito de dente:** as cultivares foram semeadas em vasos plásticos com capacidade para 5L de terra e mantidas, em casa de vegetação até o estágio V1 (FEHR & CAVINESS, 1977), ocasião em que foi efetuada a inoculação de *F. tucumaniae* através do método do palito de dente colonizado pelo patógeno (YORINORI, 1996 e KLINGELFUSS, 2001a). A inoculação foi feita introduzindo-se no hipocótilo o palito de dente colonizado, cerca de 1,5 cm abaixo do nó cotiledonar. Após a inoculação as plantas foram colocadas em câmara úmida por 48 horas e, posteriormente, mantidas sob nebulização.

● **método do disco de colônia:** a inoculação foi realizada no momento da semeadura, onde no fundo de cada cova ($\pm$ 3cm de profundidade) foram colocados cinco discos colonizados com o patógeno. Estes foram cobertos com uma camada de terra de cerca de 1 cm e, em seguida, foram colocadas as sementes de soja, que também foram cobertas com terra. Desta forma, os discos de colônia do patógeno ficaram 1 cm abaixo das sementes de soja, evitando-se o contato direto destas com o inóculo. Aos 13 dias após a emergência foi efetuada outra inoculação, após o encharcamento da terra, pressionando-se dois discos de colônia (a cerca de 1 cm de profundidade), com o auxílio de um bastão de vidro, junto à região do colo de cada planta e em posição oposta, de forma semelhante a utilizada por FRONZA (2003).

● **método de grãos de sorgo colonizados com o patógeno:** a inoculação foi realizada no momento da semeadura, utilizando-se a metodologia descrita para disco de colônia.

● **método dos grãos de aveia colonizados com o patógeno:** a inoculação foi realizada seguindo-se metodologia de grãos de sorgo colonizados com o patógeno.

A inoculação foi efetuada em duas épocas, outono/inverno de 2005 e primavera/verão de 2005/2006.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo a parcela constituída por um vaso com cinco plântulas. As testemunhas foram efetuadas apenas nas cultivares suscetíveis.

A avaliação dos sintomas foi efetuada semanalmente, 15 dias após inoculação, totalizando seis semanas (outono/inverno 2005), e cinco semanas (primavera/verão

2005/2006), através de escala de notas de 0 a 5, proposta por YORINORI (1997a), e adaptada por FRANCO (2004), que se baseia no nível de infecção (NI), onde 0 = planta sem sintomas; 1 = traços a 10% da planta infectada (PI); 2 = 11 a 25% da PI; 3 = 26 a 50% da PI; 4 = 51 a 75% da PI e; 5 = 76 a 100% da PI. Como planta infectada (PI) considerou-se aquelas que apresentavam lesões na haste e folhas primárias e/ou trifolioladas “carijó”, sintoma típico da síndrome da morte súbita.

A avaliação também foi efetuada através da escala de notas baseada na severidade dos sintomas foliares utilizada por HARTMAN et al. (1997) e modificada por FRONZA (2003).

Também foi efetuada a contagem de plântulas sadias (plântula sem sintoma ou com necrose ao redor do palito, mas com desenvolvimento normal), plântulas infectadas PI” (plântula com necrose e avermelhamento ao redor do palito, mas com desenvolvimento normal); plântulas infectadas PI (plântula com necrose ao redor do palito, acompanhada de clorose, murcha ou necrose de uma ou mais folhas e com leve redução do desenvolvimento da parte aérea) e plântulas mortas PM (plântula morta ou severamente afetada, com redução do desenvolvimento, clorose ou necrose entre as nervuras das folhas superiores). O critério de separação das reações das variedades foi baseado na porcentagem de plântulas mortas (%PM), calculado com base nos valores de PM, PI, PI” e TP (total de plantas inoculadas). O cálculo da porcentagem de plântulas mortas (%PM) foi feito utilizando a seguinte fórmula: $\%PM = (PM + PI/2 + PI''/4)100/TP$. A reação das variedades foi discriminada em cinco categorias, conforme a porcentagem de plântulas mortas (%PM), de acordo com o seguinte critério: R = Resistente: 0% a 25%PM; MR = Moderadamente Resistente: 26% a 50%PM; MS = Moderadamente Suscetível: 51% a 75%PM; S = Suscetível: 76% a 90%PM; AS = Altamente Suscetível: acima de 90%PM. Esta forma de avaliação da reação de plântulas a *F. tucumaniae* foi baseada na proposta de YORINORI (1996) para avaliação do cancro da haste.

Após avaliação da reação de plântulas foi efetuada a medida da altura das plantas e do comprimento da lesão externa e interna da haste, com auxílio de uma régua graduada. Realizou-se também a avaliação dos sintomas presentes na raiz, através de escala de notas de 1 a 3 (onde 1= raiz sem sintoma; 2= raiz pivotante

totalmente ou parcialmente necrosada, porém com raízes secundárias normais; 3= sistema radicular totalmente necrosado). Para isso efetuou-se a lavagem das raízes em água corrente, em seguida fez-se a avaliação visual e, posteriormente, a secagem em estufa, para obtenção da massa seca da raiz por parcela experimental, com uso de balança com precisão de 0,0001g.

3. Análises estatísticas dos resultados

Os resultados obtidos, em casa de vegetação e folhas destacadas, foram submetidos a análises de variância pelo teste F, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No experimento com folhas destacadas utilizou-se o esquema fatorial 4 x 4 x 4 (4 cultivares, 4 métodos e 4 ambientes).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Avaliação de diferentes métodos de inoculação em folhas destacadas

1.1. Avaliação dos métodos de inoculação em folhas destacadas enraizadas em papel de filtro e em terra

Na tabela 1 estão os resultados do nível de infecção de *F. tucumaniae* obtidos em folhas destacadas de quatro diferentes variedades de soja inoculadas por diferentes métodos e incubadas em quatro ambientes (combinação de dois substratos e duas temperaturas). A cultivar FT-Estrela apresentou maior nível de infecção desde a primeira avaliação, porém só houve diferença significativa em relação as outras cultivares, na segunda e terceira avaliações. O método de inoculação com grãos de aveia, aos 30 dias após a inoculação, promoveu maior infecção nas folhas destacadas, não diferindo significativamente do método de disco de colônia. O ambiente mais propício ao desenvolvimento dos sintomas da doença foi o solo a 23°C.

Tabela 1. Nível de infecção⁽¹⁾ de *Fusarium tucumaniae* obtidos em folhas destacadas de quatro variedades de soja inoculadas por diferentes métodos e incubadas em dois substratos e duas temperaturas.

Tratamentos	1ª Avaliação 15 DAI ⁽³⁾	2ª Avaliação 22 DAI	3ª Avaliação 30 DAI
Variedade (A)			
FT-Estrela	1,60a ⁽²⁾	2,83a	3,36a
FT-Cristalina	1,36a	2,24b	2,76b
CAC-1	1,43a	2,33b	2,86b
Conquista	1,34a	2,18b	2,88b
F	2,13 ^{NS}	17,14**	13,40**
Método (B)			
Grão de sorgo	1,32ab	2,41b	3,01b
Grão de aveia	1,60a	2,92a	3,50a
Disco de colônia	1,58a	2,40b	3,03a
Palito de dente	1,23b	1,87c	2,32c
F	5,18**	35,95**	42,92**
Ambiente (C)			
Solo 15°C	1,21b	2,34b	3,23b
Solo 23°C	3,08a	4,34a	4,65a
Papel 15°C	0,56d	1,47c	2,04c
Papel 23°C	0,88c	1,44c	1,93c
F	195,76**	361,18**	292,94**
Interações			
A x B	1,74 ^{NS}	3,74**	4,82**
A x C	5,99**	5,25**	5,77**
B x C	6,37**	13,62**	15,32**
A x B x C	1,19 ^{NS}	3,25**	2,72**
F	12,19**	24,35**	21,50**
dms (5%)	0,30	0,26	0,27
C.V. (%)	50,57	26,68	22,41

⁽¹⁾ Médias do nível de infecção apresentadas em escala original, de 0 a 5 (proposta por YORINORI (1997a)), onde 0 = sem sintomas; 1 = traços a 10% de área foliar infectada (AFI); 2 = 11 a 25% AFI; 3 = 26 a 50% de AFI; 4 = 51 a 75% AFI; 5 = 76 a 100% AFI.

⁽²⁾ Médias (de 5 repetições) seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

⁽³⁾ DAI = Dias após a inoculação

Na Tabela 2, em que se apresenta a interação variedades dentro de ambientes na primeira, segunda e terceira avaliação, pode-se notar que o nível de infecção em folhas destacadas, para as quatro variedades testadas, foi superior no solo a 23°C, diferindo significativamente dos demais ambientes. Analisando-se variedades dentro de cada ambiente foi observado que no solo a 15°C, FT-Estrela e FT-Cristalina

apresentaram maiores níveis de infecção, diferindo significativamente de CAC-1 e Conquista. No solo, a 23°C, FT-Estrela, CAC-1 e Conquista apresentaram níveis de infecção superiores diferindo significativamente de FT-Cristalina. Em folhas destacadas preparadas em papel de filtro e incubadas a 15°C e 23°C não houve diferenças significativas entre as variedades. Na segunda avaliação, pode-se observar que o nível de infecção em folhas destacadas, para as quatro variedades testadas, foi superior no solo a 23°C, diferindo significativamente dos demais ambientes. Analisando-se variedades dentro de cada ambiente percebeu-se que no solo a 15°C, FT-Estrela apresentou maior nível de infecção, diferindo significativamente das demais variedades. No solo a 23°C e papel a 23°C, FT-Estrela e CAC-1 foram superiores não diferindo significativamente entre si. Já dentro de papel a 15°C não houve diferença significativa entre as variedades. Na terceira avaliação, notou-se que o nível de infecção em folhas destacadas, para as quatro variedades testadas, assim como na segunda avaliação também foi superior no solo a 23°C, diferindo significativamente dos demais ambientes. Quando se analisaram as variedades dentro de cada ambiente percebeu-se que no solo a 15°C e papel a 23°C, FT-Estrela apresentou maior nível de infecção, diferindo significativamente das demais variedades. No solo a 23°C, FT-Estrela, CAC-1 e Conquista apresentaram níveis de infecção superiores não diferindo significativamente entre si. No papel a 15°C não houve diferença significativa entre as variedades.

Tabela 2. Nível de infecção⁽¹⁾ de *Fusarium tucumaniae* em folhas destacadas de soja, na interação de variedades dentro de ambientes na primeira, segunda e terceira avaliações.

Variedades (A)	Ambientes (C)				F
	Solo 15°C	Solo 23°C	Papel 15°C	Papel 23°C	
Primeira Avaliação					
FT-Estrela	1,68Ba ⁽²⁾	3,35Aa	0,33Da	1,05Ca	63,59**
FT-Cristalina	1,58Ba	2,38Ab	0,58Ca	0,90Ca	24,23**
CAC-1	0,80Bb	3,50Aa	0,58Ba	0,83Ba	73,54**
Conquista	0,80Bb	3,10Aa	0,75Ba	0,73Ba	52,38**
F	8,73**	9,50**	1,17 ^{NS}	0,72 ^{NS}	
dms (5%)					0,59
Segunda Avaliação					
FT-Estrela	3,08Ba	4,78Aa	1,58Ca	1,90Ca	102,42**
FT-Cristalina	2,55Bb	3,78Ac	1,50Ca	1,15Cb	68,27**
CAC-1	1,90Bc	4,65Aab	1,38Ca	1,40BCab	119,71**
Conquista	1,83Bc	4,15Abc	1,43Ba	1,33Bb	86,52**
F	17,00**	10,44**	0,37 ^{NS}	5,06**	
dms (5%)					0,52
Terceira Avaliação					
FT-Estrela	3,95Ba	4,90Aa	2,00Da	2,60Ca	77,87**
FT-Cristalina	3,35Bb	4,23Ab	2,08Ca	1,38Dc	73,86**
CAC-1	2,70Bc	4,85Aa	1,90Ca	1,98Cb	86,10**
Conquista	2,93Bbc	4,63Aab	2,20Ca	1,75Cbc	72,42**
F	13,72**	4,29**	0,73 ^{NS}	11,97**	
dms (5%)					0,54

⁽¹⁾Médias do nível de infecção em escala original, de 0 a 5 (proposta por YORINORI (1997a)), onde 0 = sem sintomas; 1 = traços a 10% de área foliar infectada (AFI); 2 = 11 a 25% AFI; 3 = 26 a 50% de AFI; 4 = 51 a 75% AFI; 5 = 76 a 100% AFI.

⁽²⁾Médias (de 5 repetições) seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Na Tabela 3 está apresentada a interação de métodos dentro de ambientes. Na primeira, segunda e terceira avaliação, pode-se notar que o nível de infecção em folhas destacadas, para os quatro métodos testados, foi superior no solo a 23°C, diferindo significativamente dos demais ambientes. Na terceira avaliação, analisando-se métodos dentro de cada ambiente, verificou-se que no solo a 15°C, grãos de aveia e de sorgo proporcionaram maiores níveis de infecção, diferindo significativamente dos demais métodos. No solo a 23°C, grãos de aveia e palito de dente apresentaram níveis de infecção superiores, diferindo de grãos de sorgo e disco de colônia. No papel a 15°C, disco de colônia, grãos de sorgo e grãos de aveia foram superiores, diferindo significativamente do método do palito de dente. No papel a 23°C os métodos de grãos

de aveia e disco de colônia não diferiram entre si, porém diferiram significativamente dos métodos do palito de dente e grãos de sorgo.

Tabela 3. Nível de infecção⁽¹⁾ de *Fusarium tucumaniae* em folhas destacadas de soja, na interação de métodos dentro de ambientes na primeira, segunda e terceira avaliações.

Métodos (B)	Ambientes (C)				F
	Solo 15°C	Solo 23°C	Papel 15°C	Papel 23°C	
Primeira Avaliação					
Grão de sorgo	1,15Ba ⁽²⁾	2,60Ac	0,53Cab	1,00BCa	30,57**
Grão de aveia	1,33Ba	3,30Aab	0,48Cab	1,30Ba	54,99**
Disco de colônia	1,43Ba	2,80Abc	0,98Ba	1,10Ba	26,84**
Palito de dente	0,95Ba	3,63Aa	0,25Cab	0,10Cb	102,47**
F	1,66 ^{NS}	8,33**	3,52*	10,79**	
dms (5%)					0,59
Segunda Avaliação					
Grão de sorgo	2,50Bb	3,90Ab	1,80Ca	1,43Cb	58,20**
Grão de aveia	3,03Ba	4,80Aa	1,63Da	2,23Ca	93,00**
Disco de colônia	2,03Bbc	3,95Ab	1,63Ba	1,98Ba	54,19**
Palito de dente	1,80Bc	4,70Aa	0,83Cb	0,15Dc	196,65**
F	14,44**	11,20**	9,34**	41,84**	
dms (5%)					0,52
Terceira Avaliação					
Grão de sorgo	3,65Ba	4,33Ab	2,23Ca	1,83Cb	62,93**
Grão de aveia	3,88Ba	4,95Aa	2,50Ca	2,68Ca	59,37**
Disco de colônia	2,88Bb	4,33Ab	2,15Ca	2,75Ba	38,64**
Palito de dente	2,53Bb	5,00Aa	1,30Cb	0,45Dc	117,96**
F	18,39**	6,41**	12,19**	51,88**	
dms (5%)					0,54

⁽¹⁾Médias do nível de infecção em escala original, de 0 a 5 (proposta por YORINORI (1997a)), onde 0 = sem sintomas; 1 = traços a 10% de área foliar infectada (AFI); 2 = 11 a 25% AFI; 3 = 26 a 50% de AFI; 4 = 51 a 75% AFI; 5 = 76 a 100% AFI.

⁽²⁾Médias (de 5 repetições) seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Na Tabela 4 está apresentada a interação de métodos de inoculação dentro de variedades, na segunda e terceira avaliação. Pode-se observar que o nível de infecção em folhas destacadas, na terceira avaliação, para as cultivares FT-Estrela, FT-Cristalina e Conquista, apresentou-se superior no método de grãos de aveia, diferindo significativamente dos demais métodos. Já para CAC-1 os métodos de grãos de sorgo, grãos de aveia e disco de colônia diferiram significativamente do método do palito de dente, porém não diferiram entre si. Analisando-se variedades dentro de cada método,

percebeu-se que para o método de grãos de sorgo, a cultivar FT-Estrela apresentou nível de infecção superior, porém não diferiu de CAC-1 e Conquista. No método de disco de colônia FT-Estrela também apresentou nível de infecção superior, diferindo significativamente das demais cultivares. Já para palito de dente FT-Cristalina apresentou maior nível de infecção, porém não diferiu significativamente de FT-Estrela e CAC-1.

Tabela 4. Nível de infecção⁽¹⁾ de *Fusarium tucumaniae* em folhas destacadas de soja, na interação de métodos dentro de variedades na segunda e terceira avaliações.

Variedades (A)	Métodos (B)				F
	Grão de sorgo	Grão de aveia	Disco de Colônia	Palito de dente	
	Segunda Avaliação				
FT-Estrela	3,15Aba ⁽²⁾	3,43Aa	2,83Ba	1,93Ca	20,79**
FT-Cristalina	1,83Bc	2,85Ab	2,23Bb	2,08Ba	9,32**
CAC-1	2,55Ab	2,63Ab	2,40Aab	1,75Ba	7,77**
Conquista	2,10Bbc	2,78Ab	2,13Bb	1,73Ba	9,30**
F	16,39**	5,99**	4,67**	1,31 ^{NS}	
dms (5%)					0,52
Terceira Avaliação					
FT-Estrela	3,58Aa	3,75Aa	3,68Aa	2,45Bab	17,03**
FT-Cristalina	2,33Bb	3,35Aa	2,70Bb	2,65Ba	8,37**
CAC-1	3,08Aa	3,23Aa	3,00Ab	2,13Bab	11,18**
Conquista	3,05Ba	3,68Aa	2,73Bb	2,05Cb	20,78**
F	12,02**	2,89*	9,36**	3,58*	
dms (5%)					0,54

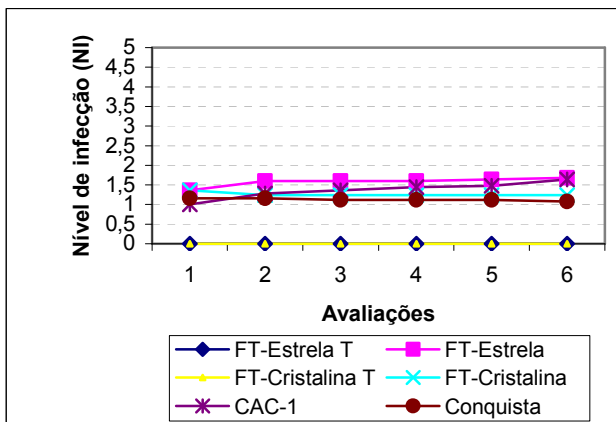
⁽¹⁾Médias do nível de infecção em escala original, de 0 a 5 (proposta por YORINORI (1997a)), onde 0 = sem sintomas; 1 = traços a 10% de área foliar infectada (AFI); 2 = 11 a 25% AFI; 3 = 26 a 50% de AFI; 4 = 51 a 75% AFI; 5 = 76 a 100% AFI.

⁽²⁾Médias (de 5 repetições) seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

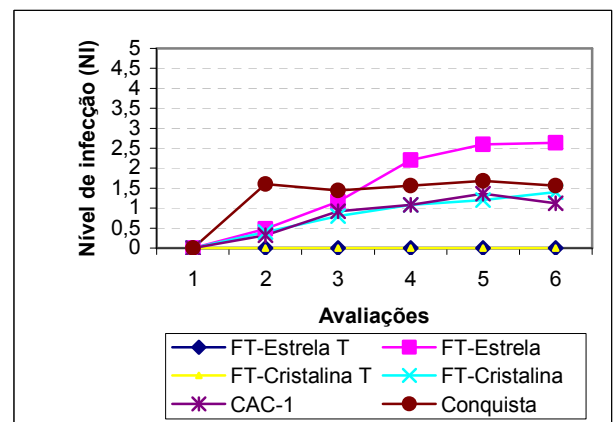
2. Avaliação de métodos de inoculação em plântulas cultivadas em casa de vegetação – outono/inverno 2005

Na Figura 1 estão apresentados os resultados de avaliações do nível de infecção (NI) de variedades de soja cultivadas no outono/inverno, em condições de casa de vegetação inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, pelos métodos do palito de dente (PD), discos de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS) colonizados.

Nota-se que na 1ª avaliação, efetuada aos 15 dias após a inoculação, nos tratamentos inoculados pelos métodos de discos de colônia, grãos de aveia e grãos de sorgo não foram observados sintomas da doença. No método do palito de dente observaram-se os primeiros sintomas, sendo que em alguns casos reduzidos a apenas um avermelhamento ao redor do palito de dente. Observando-se a evolução dos sintomas durante as seis semanas de avaliações, verificou-se que no método do palito de dente a evolução foi menor do que nos outros métodos. No método de discos de colônia observou-se, na sexta avaliação, que FT-Estrela apresentou maior nível de infecção. No método de grãos de aveia a cultivar FT-Estrela apresentou maior nível de infecção, e o menor nível de infecção foi obtido na cultivar CAC-1. Já no método de grãos de sorgo, observou-se uma evolução do nível de infecção da doença semanalmente, e na sexta avaliação observou-se que a cultivar FT-Cristalina apresentou maior nível de infecção, com relação as outras cultivares avaliadas e com relação aos outros métodos.



Palito de dente



Disco de colônia

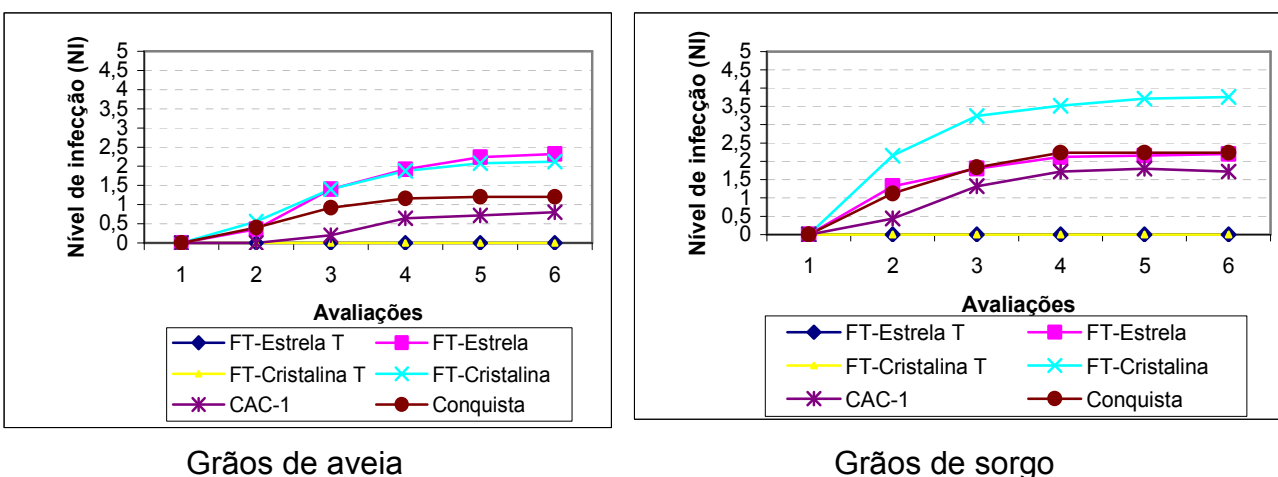


Figura 1. Nível de infecção (NI) obtidos em seis avaliações de variedades de soja cultivadas no outono/inverno, em condições de casa de vegetação, inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, pelos métodos do palito de dente (PD), discos de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS) colonizados.

Na Figura 2 estão apresentados os resultados das avaliações da severidade dos sintomas foliares (SSF) de variedades de soja cultivadas no outono/inverno em condições de casa de vegetação inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, pelos métodos do palito de dente (PD), discos de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS) colonizados. Nota-se que na primeira avaliação aos 15 dias após a inoculação os tratamentos inoculados pelos métodos de discos de colônia, grãos de aveia e grãos de sorgo não foram observados sintomas da doença. Como já foi apresentado na figura anterior (Figura 1) para nível de infecção da doença, apenas no método do palito de dente é que apareciam os primeiros sintomas, sendo que em alguns casos reduzidos a apenas um avermelhamento ao redor do palito de dente. Observando-se a evolução dos sintomas durante as seis semanas de avaliações, verificou-se que no método do palito de dente a evolução foi menor do que nos outros métodos. No método de discos de colônia observou-se, na sexta avaliação, que FT-Estrela apresentou maior nível de infecção. No método de grãos de aveia, as cultivares FT-Estrela e FT-Cristalina apresentaram maior nível de infecção. Já no método de grãos de sorgo observou-se

uma evolução da severidade dos sintomas foliares da doença semanalmente, e na sexta semana percebeu-se que a cultivar FT-Cristalina apresentou maior severidade dos sintomas foliares. As demais cultivares FT-Estrela, CAC-1 e MG/BR 46 (Conquista), apresentaram menor severidade dos sintomas foliares.

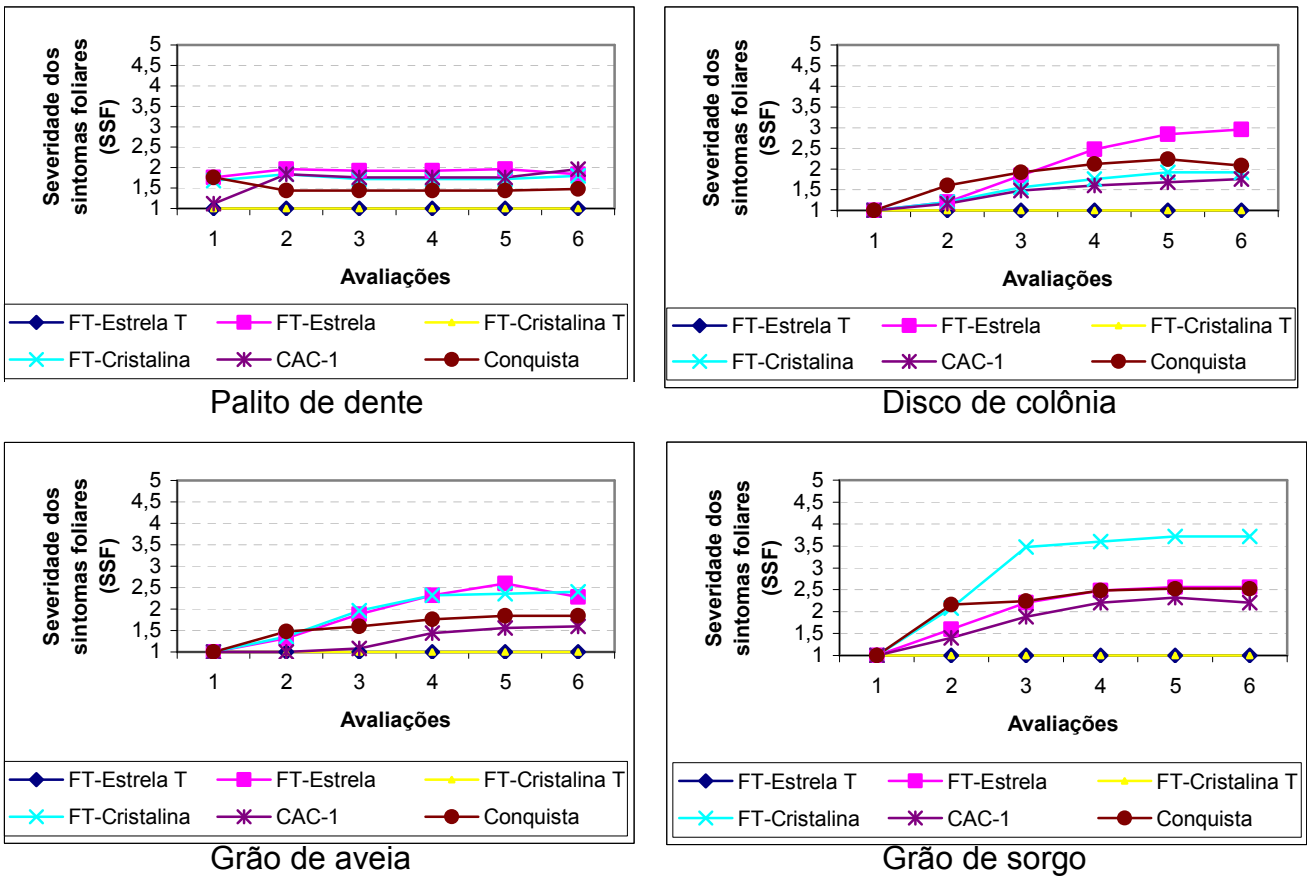


Figura 2. Severidade dos sintomas foliares (SSF) observados em seis avaliações de variedades de soja cultivadas no outono/inverno, em condições de casa de vegetação inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, pelos métodos do palito de dente (PD), discos de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS) colonizados.

Na Tabela 5 estão os resultados analisados estatisticamente, da sexta avaliação, tanto para nível de infecção quanto para severidade dos sintomas foliares.

Tabela 5. Severidade dos sintomas foliares (SSF)⁽¹⁾ e nível de infecção (NI)⁽²⁾ obtidos na sexta avaliação, de variedades de soja cultivadas no outono/inverno, em condições de casa de vegetação e inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, pelos métodos do palito de dente (PD), discos de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS) colonizados.

6ª avaliação SSF (50 dias após a inoculação)				
Genótipos	SSF (PD)	SSF (DC)	SSF (GA)	SSF (GS)
FT-Estrela T	1,00b	1,00b	1,00b	1,00c
FT-Estrela	1,84a	2,96a	2,28a	2,56b
FT-CristalinaT	1,00b	1,00b	1,00b	1,00c
FT-Cristalina	1,80a	1,92ab	2,40a	3,72a
CAC-1	1,96a	1,76ab	1,60ab	2,20b
Conquista	1,48ab	2,08ab	1,84ab	2,52b
Teste F	12,28**	6,74**	7,24**	16,31**
C.V. (%)	18,06	35,55	29,84	26,59
dms (5%)	0,53	1,24	0,98	1,13
6ª avaliação NI (50 dias após a inoculação)				
Genótipos	NI (PD)	NI (DC)	NI (GA)	NI (GS)
FT-Estrela T ⁽⁵⁾	0,00b ^{(3),(4)}	0,00b	0,00c	0,00c
FT-Estrela	1,68a	2,64a	2,32a	2,20b
FT-CristalinaT ⁽⁵⁾	0,00b	0,00b	0,00c	0,00c
FT-Cristalina	1,24a	1,40ab	2,12ab	3,76a
CAC-1	1,64a	1,12ab	0,80bc	1,72b
Conquista	1,08a	1,56ab	1,20abc	2,24b
Teste F	27,32**	5,51**	10,95**	22,39**
C.V. (%)	34,74	85,86	63,24	41,52
dms (5%)	0,64	1,88	1,33	1,34

⁽¹⁾Severidade dos sintomas foliares avaliado através de escala de notas de 1 a 5 (proposta por HARTMAN et al., 1997 e modificada por FRONZA, 2003) sendo que : 1=ausência de sintomas foliares visíveis; 2=leve desenvolvimento dos sintomas, com clorose em mosaico, e deformação ou encarquilhamento dos folíolos; 3=moderado desenvolvimento dos sintomas, com clorose internerval e necrose na borda dos folíolos; 4=elevado desenvolvimento dos sintomas, com clorose e necrose internerval (até 50% de área foliar afetada por necrose); 5=severo desenvolvimento dos sintomas, com clorose e necrose internerval e/ou plantas mortas ou severa restrição no desenvolvimento das plantas (51 a 100% de área foliar afetada por necrose).

⁽²⁾Nível de infecção avaliado através de escala de notas de 0 a 5 (proposta por YORINORI (1997a), e adaptada por FRANCO (4)), sendo que: 0 = planta sem sintomas; 1 = traços a 10% da planta infectada(PI); 2 = 11 a 25% da PI; 3 = 26 a 50% da PI; 4 = 51 a 75% da PI e 5 = 76 a 100% da PI.

⁽⁴⁾Média de 10 repetições (50 plantas avaliadas).

⁽³⁾Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

⁽⁵⁾Testemunhas.

As comparações de médias de comprimento (cm) da lesão externa (LE), lesão interna (LI), altura (cm) (AL) dos quatro tratamentos testados estão apresentadas na

Tabela 6. Com relação a lesão externa (LE) e lesão interna (LI) da haste, as cultivares inoculadas pelo método do palito de dente diferiram significativamente das testemunhas, com exceção para MG/BR 46 (Conquista) que não diferiu (LE) de FT-Estrela testemunha, porém todas as cultivares inoculadas não diferiram entre si.

Não se observaram reduções significativas na altura de plantas das cultivares FT-Estrela e FT-Cristalina inoculadas pelo método do palito de dente. Como a altura de plantas é uma característica agrônômica que varia de uma cultivar para outra, foram apresentadas na Tabela 6 apenas as análises das cultivares suscetíveis, pois para estas é que se incluíram as testemunhas.

Já no método do disco de colônia para lesão externa da haste não houve diferenças significativas entre os tratamentos inoculados e testemunhas. Este fato deve ocorrer pelo fato do inóculo ser colocado na terra, mais próximo do sistema radicular, local afetado pela doença, bem diferente do método do palito de dente onde o inóculo entra em contato direto com os feixes vasculares das plantas, e assim causa a lesão interna e externa, mesmo que às vezes esta seja pequena. Com relação a lesão interna, a variedade FT-Estrela apresentou maior lesão, diferindo das testemunhas, mas não diferindo das demais cultivares. FT-Estrela inoculada também apresentou menor altura de plantas (AL), diferindo significativamente da testemunha não inoculada (Tabela 6).

No método de inoculação com grãos de aveia FT-Estrela apresentou maior média de LE e LI, não diferindo estatisticamente de FT-Cristalina e Conquista. Para altura de plantas, observaram-se diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos inoculados e não inoculados, com redução acentuada tanto em FT-Estrela como em FT-Cristalina inoculadas.

No método de grãos de sorgo, a cultivar FT-Estrela apresentou maior lesão externa (LE) na haste não diferindo significativamente da cultivar MG/BR 46 (Conquista). Em relação a lesão interna (LI), FT-Cristalina foi a variedade que apresentou maior lesão, não diferindo significativamente dos tratamentos inoculados. A variedade FT-Cristalina T apresentou maior altura de plantas diferindo estatisticamente

de FT-Cristalina inoculada, que teve sua altura reduzida a mais da metade. O mesmo pôde ser observado para FT-Estrela T e inoculada.

Tabela 6. Comprimento (cm) da lesão externa (LE), lesão interna (LI) e altura (cm) (AL) de plântulas de soja cultivadas em casa de vegetação (outono/inverno) e inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, pelos métodos do palito de dente (PD), disco de colônia (DC), grão de aveia (GA) e grão de sorgo (GS).

Variedades	Palito de Dente		Discos de colônia		Grãos de aveia		Grãos de sorgo	
	LE	LI	LE	LI	LE	LI	LE	LI
FT-Estrela T ⁽³⁾	0,64bc ⁽¹⁾	0,43b	0,00a	0,00b	0,00b	0,00b	0,00c	0,00b
FT-Estrela	1,87a	4,44a	0,84a	11,21a	5,84a	6,54a	0,38a	2,22ab
FT-CristalinaT ⁽³⁾	0,45c	0,19b	0,00a	0,00b	0,00b	0,00b	0,00c	0,00b
FT-Cristalina	2,38a	4,46a	1,78a	6,48ab	2,56ab	3,57ab	0,17bc	9,46a
CAC-1	1,86a	4,52a	0,37a	1,72ab	0,40b	1,41b	0,11bc	4,20ab
Conquista	1,39ab	3,69a	0,27a	3,99ab	1,02ab	2,99ab	0,26ab	4,04ab
F ⁽²⁾	14,09**	43,77**	1,70 ^{NS}	4,03*	3,98**	6,46**	10,46**	4,71**
C.V. (%)	9,51	10,65	32,28	51,30	42,43	33,09	4,42	42,63
dms (5%)	0,29	0,40	0,79	1,88	1,20	1,08	0,09	1,53
Variedades	AL		AL		AL		AL	
FT-Estrela T ⁽³⁾	68,24a		91,37a		95,60a		90,30a	
FT-Estrela	69,70a		70,96b		66,18b		62,16b	
F	0,14 ^{NS}		13,32**		83,69**		37,54**	
C.V. (%)	9,06		10,90		6,29		9,53	
dms (5%)	9,11		12,89		7,41		10,59	
FT-CristalinaT ⁽³⁾	93,50a		119,39a		117,52a		115,28a	
FT-Cristalina	87,26a		91,02a		82,22b		50,76b	
F	0,65 ^{NS}		3,86 ^{NS}		7,67*		65,75**	
C.V. (%)	13,54		21,71		20,18		15,15	
dms (5%)	17,84		33,31		29,38		18,34	

⁽¹⁾Médias (de 5 repetições (25 plantas avaliadas)) seguidas da mesma letra na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

⁽²⁾Análise de variância efetuada com resultados transformados em $\sqrt{x+1,0}$, para lesão externa e interna da haste.

⁽³⁾Testemunhas.

Na Figura 3 pode-se observar a agressividade de *F. tucumaniae* em plantas de FT-Cristalina inoculadas com grãos de sorgo colonizados pelo patógeno.



Detalhe do sintoma típico da
doença a folha “carijó”

Figura 3. Sintomas observados na cultivar FT-Cristalina inoculada (vaso esquerda) com *F. tucumaniae* pelo método do grão de sorgo, e testemunha (vaso direita) em condição de casa de vegetação.

Na Tabela 7 estão apresentadas as médias de porcentagem de plântulas mortas (%PM) obtidas em variedades de soja inoculadas com *Fusarium tucumaniae* pelos métodos do palito de dente (PD), disco de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS), em condições de casa de vegetação (outono/inverno). De maneira geral, em todos os tratamentos observou-se reação de moderada resistência à *Fusarium tucumaniae*, com exceção de FT-Cristalina, no tratamento em que se empregou o método de inoculação de grãos de sorgo colonizados, que com 68% de plântulas

mortas, caracterizou a cultivar como moderadamente suscetível. LEÃO et al. (1998) e FRONZA (2003), também classificaram FT-Cristalina como suscetível a PVR. A cultivar FT-Cristalina apresentou-se também, de maneira geral, com as maiores médias de lesão interna da haste, e maiores reduções nas alturas de plantas (Tabela 6).

Tabela 7. Porcentagem de plântulas mortas (%PM)⁽²⁾ obtidas em variedades de soja inoculadas com *Fusarium tucumaniae* pelos métodos do palito de dente (PD), disco de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS), em condições de casa de vegetação (outono/inverno).

Variedades	PD		DC		GA		GS	
	%PM	Reação ⁽³⁾	%PM	Reação	%PM	Reação	%PM	Reação
FT-Estrela T ⁽⁴⁾	0 ⁽¹⁾	---	0	---	0	---	0	---
FT-Estrela	44	MR	50	MR	46	MR	42	MR
FT-CristalinaT ⁽⁴⁾	0	---	0	---	0	---	0	---
FT-Cristalina	31	MR	24	MR	40	MR	68	MS
CAC-1	37	MR	20	MR	24	MR	34	MR
Conquista	32	MR	30	MR	22	MR	44	MR

⁽¹⁾Média de 5 repetições (25 plantas avaliadas)

⁽²⁾%PM = $(PM + PI/2 + PI^*/4)100/TP$, onde: PM = número de plântulas mortas; PI*= plântula infectada (com necrose e avermelhamento ao redor do palito, mas com desenvolvimento normal); PI = número de plântulas infectadas; TP = total de plântulas inoculadas (YORINORI, 1996)

⁽³⁾R = Resistente: 0% a 25%PM; MR = Moderadamente Resistente: 26% a 50%PM; MS = Moderadamente Suscetível: 51% a 75%PM; S = Suscetível: 76% a 90%PM; AS = Altamente Suscetível: acima de 90%PM (YORINORI, 1996).

⁽⁴⁾Testemunhas.

Na Tabela 8 estão apresentadas as médias do nível de infecção de raiz de plântulas de soja cultivadas em casa de vegetação (outono/inverno) e inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, pelos métodos do palito de dente (PD), discos de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS). Nota-se que para o tratamento em que se utilizou o método do palito de dente, as variedades inoculadas FT-Estrela, FT-Cristalina e CAC-1 não apresentaram diferenças significativas entre si, apresentando maiores valores de nível de infecção. A cultivar MG/BR 46 (Conquista) apresentou o menor nível de infecção quando comparado com os demais tratamentos inoculados, e não diferiu significativamente das testemunhas não inoculadas. Quando se utilizaram discos de colônia e grãos de aveia, FT-Estrela e FT-Cristalina apresentaram maiores valores de nível de infecção, diferindo significativamente dos demais tratamentos, exceto da

cultivar Conquista. No método de grãos de sorgo não houve diferenças significativas entre os tratamentos inoculados, estes diferiram apenas das testemunhas, porém FT-Cristalina apresentou um dos maiores valores de nível de infecção de raiz, em relação aos demais tratamentos e métodos analisados. Os resultados indicam que este método é um dos mais promissores, pelo nível de infecção que causou nas cultivares suscetíveis e pela %PM (Tabela 7), o que permite melhor caracterização das cultivares classificadas como suscetíveis e resistentes.

Tabela 8. Nível de infecção de raiz⁽²⁾ de plântulas de soja cultivadas em casa de vegetação (outono/inverno) e inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, pelos métodos do palito de dente (PD), disco de colônia (DC), grão de aveia (GA) e grão de sorgo (GS).

Variedades	Nível de infecção de raiz			
	PD	DC	GA	GS
FT-Estrela T ⁽⁴⁾	1,00b ^{(1),(3)}	1,00c	1,00c	1,00b
FT-Estrela	1,64a	2,40a	2,28a	1,80a
FT-CristalinaT ⁽⁴⁾	1,00b	1,00c	1,00c	1,00b
FT-Cristalina	1,82a	2,00a	2,24a	2,28a
CAC-1	1,76a	1,64b	1,64b	1,72a
Conquista	1,20b	2,00ab	1,88b	1,80a
F	24,39**	18,06**	54,66**	15,20**
C.V. (%)	12,27	18,06	10,35	18,11
dms (5%)	0,34	0,59	0,34	0,57

⁽¹⁾Média de 5 repetições (25 plantas avaliadas)

⁽²⁾Escala de notas que varia de 1 a 3 (onde 1= raiz sem sintoma; 2= raiz pivotante totalmente ou parcialmente necrosada, porém com raízes secundárias normais; 3= sistema radicular totalmente necrosado).

⁽³⁾Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

⁽⁴⁾Testemunhas.

Na Tabela 9 estão apresentadas as médias de massa seca de raiz, de plântulas de soja cultivadas em casa de vegetação (outono/inverno) e inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, pelos métodos do palito de dente (PD), discos de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS). Nesta Tabela são apresentadas apenas as análises das cultivares suscetíveis, pois para estas é que se incluíram as testemunhas, já que o sistema radicular difere de variedade para variedade. Observaram-se diferenças significativas somente nos tratamentos em que se utilizaram os métodos do palito de

dente e de grãos de sorgo. Para o método do palito de dente a cultivar FT-Cristalina inoculada apresentou maior média de massa seca de raiz, o que deve ter ocorrido pelo fato da inoculação não ser diretamente feita no sistema radicular. Já no método de grãos de sorgo, as duas cultivares inoculadas, FT-Estrela e FT-Cristalina, apresentaram menor média de massa seca de raiz, diferindo significativamente das testemunhas.

Tabela 9. Massa seca de raiz (g) de plântulas de soja cultivadas em casa de vegetação (outono/inverno) e inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, pelos métodos do palito de dente (PD), discos de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS).

Variedades	Massa seca de raiz (g)			
	PD	DC	GA	GS
FT-Estrela T ⁽³⁾	4,61a ⁽¹⁾	1,30a ⁽²⁾	1,32a	2,28a
FT-Estrela	6,15a	1,16a	1,20a	1,56b
F	4,04 ^{NS}	0,23 ^{NS}	0,36 ^{NS}	10,51*
CV(%)	22,60	37,24	24,34	18,26
DMS (5%)	1,77	0,68	1,26	0,51
FT-CristalinaT ⁽³⁾	3,09b	1,45a	1,64a	2,81a
FT-Cristalina	6,02a	1,15a	1,17a	0,80b
F	7,78*	1,54 ^{NS}	3,38 ^{NS}	14,47**
C.V. (%)	36,46	29,16	28,50	46,36
dms (5%)	2,42	0,55	0,59	1,22

⁽¹⁾Média de 5 repetições (25 plantas avaliadas)

⁽²⁾Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

⁽³⁾Testemunhas.

A Figura 4 ilustra a escala de notas do nível de infecção de raízes. Da esquerda para direita, notas 1, 2 e 3, onde, 1= raiz sem sintoma; 2= raiz pivotante totalmente ou parcialmente necrosada, porém com raízes secundárias normais; 3= sistema radicular totalmente necrosado). Uma das dificuldades encontradas para realizar esta avaliação foi o fato de que as raízes inoculadas com grãos de sorgo, de aveia e discos de colônia, apresentaram avermelhamento na parte externa da raiz pivotante, e algumas das testemunhas também. A maneira utilizada para evitar esse erro na hora de atribuir as notas 1 e 2, foi cortando-se longitudinalmente a raiz principal para verificar a presença de coloração escura (necrose) na parte interna.

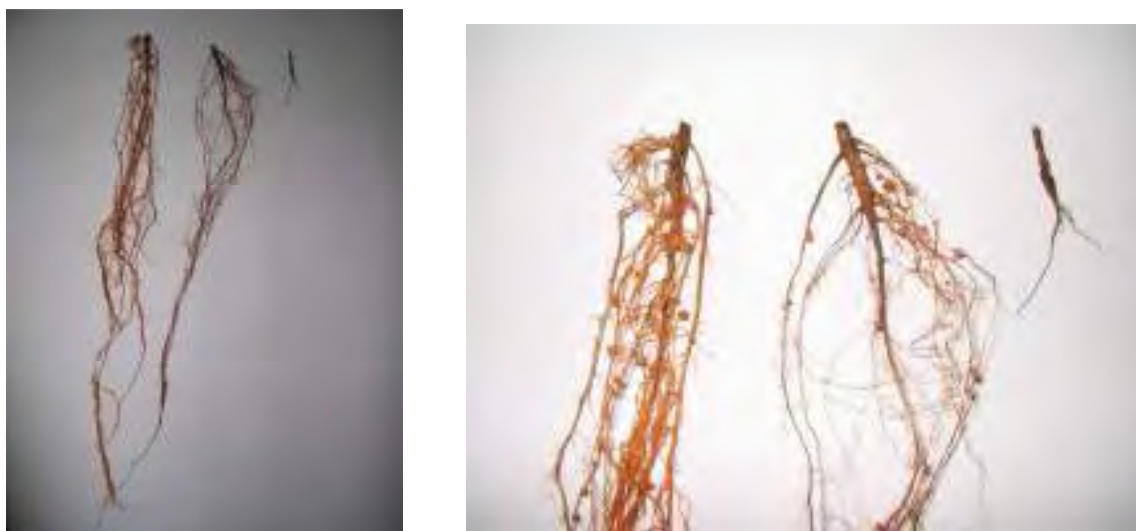


Figura 4. Notas utilizadas para avaliação do nível de infecção de raízes. Da esquerda para direita, notas 1, 2 e 3, onde 1= raiz sem sintoma; 2= raiz pivotante totalmente ou parcialmente necrosada, porém com raízes secundárias normais; 3= sistema radicular totalmente necrosado.

Na Tabela 10 podem ser observados valores dos coeficientes de correlação entre nível de infecção (NI), severidade dos sintomas foliares (SSF), porcentagem de plântulas mortas (%PM), nível de infecção de raiz (NIR) e massa seca de raiz (MSR), em plântulas de soja inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, para o método do palito de dente, disco de colônia, grãos de aveia e grãos de sorgo. Nos quatro métodos avaliados observou-se correlação positiva e significativa a 1% de probabilidade entre NI com SSF, %PM e NIR, entre SSF com %PM e NIR, e entre %PM com NIR. Para palito de dente houve correlação positiva e significativa a 5% de probabilidade entre NIR e MSR. Para discos de colônia observou-se que correlação negativa e significativa a 1% de probabilidade ocorreu entre NI e MSR, indicando que quanto maior o nível de infecção, menor a massa seca de raiz. Correlações negativas e significativas a 5% de probabilidade ocorreram entre SSF e MSR e entre %PM e MSR. No método de grãos de aveia observou-se correlação negativa e significativa a 5% de probabilidade entre NI e MSR, e entre SSF e MSR indicando que quanto maior o nível de infecção e a severidade dos sintomas foliares menor a massa seca de raiz. Para o método de grãos

de sorgo correlação negativa e significativa a 1% de probabilidade ocorreu entre MSR e todos os outros fatores avaliados.

Tabela 10. Coeficientes de correlação[#] entre nível de infecção (NI), severidade dos sintomas foliares (SSF), porcentagem de plântulas mortas (%PM), nível de infecção de raiz (NIR) e massa seca de raiz (MSR), em plântulas de soja inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, para o método do palito de dente, disco de colônia, grãos de aveia e grãos de sorgo (outono/inverno).

Palito de dente					
	NI	SSF	%PM	NIR	MSR
NI	---	0,90** ⁽¹⁾	0,96**	0,78**	0,30
SSF		---	0,84**	0,74**	0,33
%PM			---	0,77**	0,30
NIR				---	0,42*
MSR					---
Disco de colônia					
NI	---	0,98**	0,97**	0,84**	-0,46**
SSF		---	0,99**	0,84**	-0,42*
%PM			---	0,86**	-0,39*
NIR				---	-0,32
MSR					---
Grãos de aveia					
NI	---	0,95**	0,95**	0,91**	-0,42*
SSF		---	0,92**	0,88**	-0,43*
%PM			---	0,90**	-0,27
NIR				---	-0,25
MSR					---
Grãos de sorgo					
NI	---	0,99**	0,99**	0,94**	-0,68**
SSF		---	0,99**	0,94**	-0,67**
%PM			---	0,94**	-0,68**
NIR				---	-0,56**
MSR					---

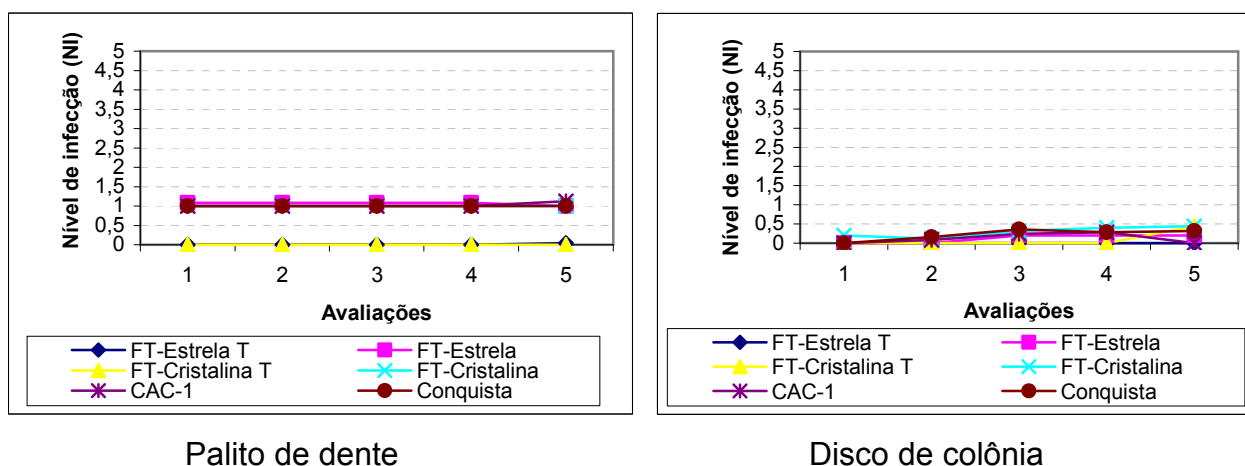
[#] Trinta pares de dados correlacionados.

^{(1)**} significativo a 1% de probabilidade.

* significativo a 5% de probabilidade.

3. Avaliação de métodos de inoculação em plântulas cultivadas em casa de vegetação - primavera/verão 2005/2006

Na Figura 5 estão apresentados os resultados de avaliações do nível de infecção (NI) de variedades de soja cultivadas na primavera/verão, em condições de casa de vegetação inoculadas com *F. tucumaniae*, pelos métodos do palito de dente (PD), discos de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS) colonizados. Nota-se que na 1ª avaliação, efetuada aos 15 dias após a inoculação, nos tratamentos inoculados quase não foram observados sintomas da doença. No método do palito de dente observaram-se os primeiros sintomas, sendo que na maioria dos casos reduzidos a apenas um avermelhamento ao redor do palito de dente e ausência de sintomas foliares, atribuindo-se a nota 1. No decorrer de seis semanas de avaliações, verificou-se evolução baixa dos sintomas, chegando a não apresentar na 6ª avaliação diferenças significativas entre as cultivares inoculadas, para todos os métodos. A baixa infecção e incidência da doença podem ser atribuídas a diversos fatores. A temperatura pode não ter favorecido o desenvolvimento da doença já que em experimento conduzido no outono/inverno a incidência e severidade da doença foram maiores do que na primavera/verão.



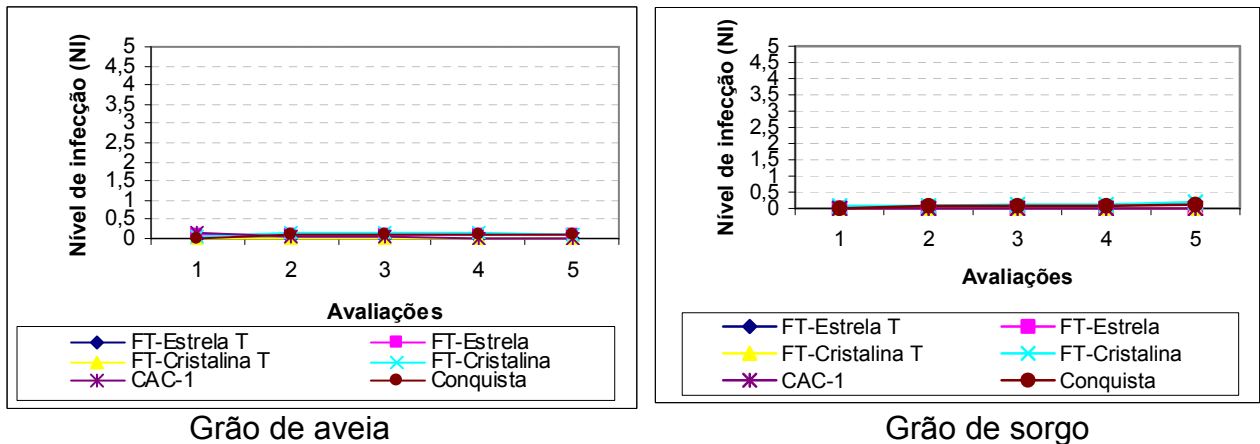
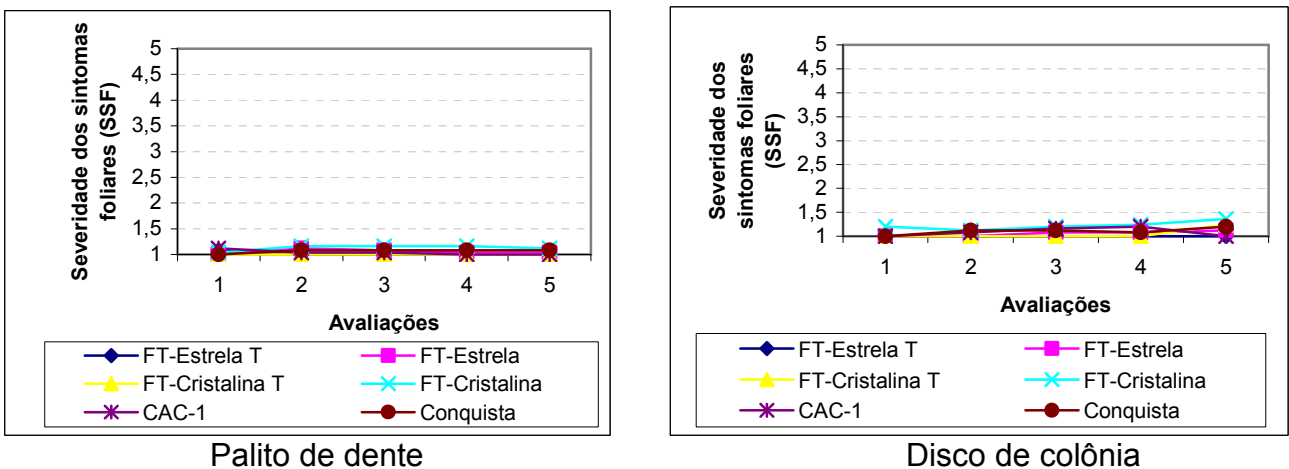


Figura 5. Nível de infecção (NI) de *Fusarium tucumaniae* obtidas em variedades de soja cultivadas na primavera/verão em condições de casa de vegetação, inoculadas pelos métodos do palito de dente (PD), discos de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS) colonizados.

Na Figura 6 estão apresentados os resultados das avaliações da severidade dos sintomas foliares (SSF) de variedades de soja cultivadas na primavera/verão 2005/2006 em condições de casa de vegetação inoculadas com *F. tucumaniae*, pelos métodos do palito de dente (PD), discos de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS) colonizados. Da mesma forma que na Figura 5 não ocorreu evolução da doença nas seis semanas de avaliações, e poucos sintomas foliares estavam visíveis.



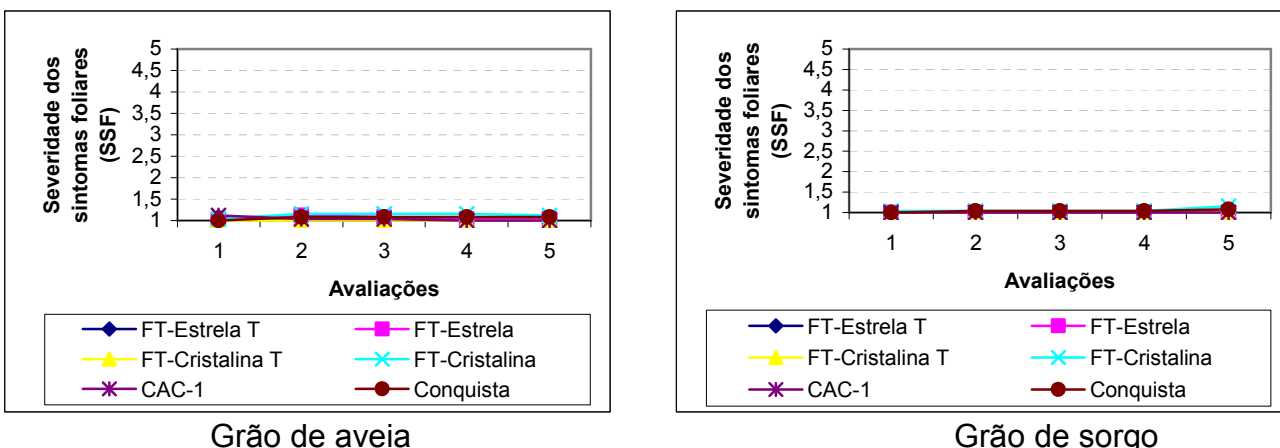


Figura 6. Severidade dos sintomas foliares de *Fusarium tucumaniae* obtidas em variedades de soja cultivadas na primavera/verão em condições de casa de vegetação, inoculadas pelos métodos do palito de dente (PD), discos de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS) colonizados.

As comparações de médias de comprimento (cm) da lesão externa (LE), lesão interna (LI), altura (cm) de plantas (AL) dos quatro tratamentos testados estão apresentadas na Tabela 11. Com relação a lesão externa (LE) da haste, as cultivares inoculadas pelo método do palito de dente diferiram significativamente das testemunhas, porém todas não diferiram entre si. Quanto a lesão interna (LI) FT-Cristalina inoculada, CAC-1 e Conquista diferiram significativamente das testemunhas.

Não se observaram reduções acentuadas na altura de plantas inoculadas pelo método do palito de dente. Não houve diferenças estatísticas significativas entre FT-Estrela inoculada e não inoculada, da mesma forma que para FT-Cristalina inoculada e não inoculada. Como a altura de plantas é uma característica agrônômica que varia de uma cultivar para outra, são apresentadas na Tabela 11, apenas as análises das cultivares suscetíveis, pois para estas é que se incluíram as testemunhas.

Já no método do disco de colônia para lesão externa e interna da haste não houve diferenças significativas entre os tratamentos inoculados e testemunhas. Com relação a altura, FT-Cristalina inoculada diferiu significativamente de FT-Cristalina T (Tabela 11), apresentando altura menor.

No método de inoculação com grãos de aveia não houve diferenças estatísticas significativas entre as LE das variedades, assim como ocorreu para o método de disco de colônia. Nestes métodos o inóculo é colocado na terra, mais próximo do sistema

radicular, local afetado pela doença, bem diferente do método do palito de dente onde o inóculo entra em contato direto com os feixes vasculares das plantas, e assim causa a lesão interna e externa, mesmo que às vezes esta seja pequena. Já para lesão interna (LI), FT-Estrela apresentou a maior LI, diferindo significativamente das demais cultivares, com exceção de FT-Cristalina. Para altura de plantas, não observaram-se diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos.

No método de grãos de sorgo, não houve diferenças estatísticas significativas entre LE e LI das variedades, assim como ocorreu para o método de disco de colônia e grãos de aveia. Com relação à altura de plantas FT-Cristalina não diferiu de sua testemunha, já FT-Estrela testemunha diferiu significativamente de FT-Estrela inoculada.

Tabela 11. Comprimento (cm) da lesão externa (LE), lesão interna (LI) e altura (cm) (AL) de plântulas de soja cultivadas em casa de vegetação (primavera/verão) e inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, pelos métodos do palito de dente (PD), disco de colônia (DC), grão de aveia (GA) e grão de sorgo (GS).

Variedades	Palito de Dente		Discos de colônia		Grãos de aveia		Grãos de sorgo	
	LE	LI	LE	LI	LE	LI	LE	LI
FT-Estrela T ⁽³⁾	0,34b ⁽¹⁾	0,69b	0,00a	0,00a	0,00a	0,00b	0,00a	0,00a
FT-Estrela	1,91a	2,43ab	0,22a	0,44a	0,14a	1,32a	0,00a	0,00a
FT-CristalinaT ⁽³⁾	0,22b	0,49b	0,83a	0,34a	0,00a	0,00b	0,00a	0,00a
FT-Cristalina	1,94a	5,24a	0,32a	0,81a	0,08a	0,32ab	0,00a	0,00a
CAC-1	1,58a	3,44a	0,00a	0,00a	0,02a	0,00b	0,08a	0,08a
Conquista	1,43a	3,61a	0,34a	0,60a	0,50a	0,04b	0,04a	0,04a
F ⁽²⁾	48,54**	9,87**	1,00 ^{NS}	1,32 ^{NS}	2,11 ^{NS}	3,92**	3,05*	3,05*
C.V. (%)	5,94	19,41	20,08	20,99	11,13	19,22	2,12	2,12
dms (5%)	0,17	0,69	0,44	0,47	0,23	0,41	0,04	0,04
Variedades	AL		AL		AL		AL	
	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL
FT-Estrela T ⁽³⁾	81,56a	108,56a	104,08a	101,68b				
FT-Estrela	73,32a	104,88a	109,92a	116,75a				
F	0,91 ^{NS}	0,58 ^{NS}	3,13 ^{NS}	10,92*				
C.V. (%)	17,61	7,16	4,88	6,60				
dms (5%)	19,88	11,13	7,62	10,51				
FT-CristalinaT ⁽³⁾	74,52a	132,52a	116,62a	116,44a				
FT-Cristalina	74,11a	103,72b	124,68a	125,46a				
F	0,03 ^{NS}	14,94**	1,43 ^{NS}	2,51 ^{NS}				
C.V. (%)	4,71	9,97	8,83	7,45				
dms (5%)	5,10	17,18	15,53	13,13				

⁽¹⁾Médias (de 5 repetições (25 plantas avaliadas)) seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

⁽²⁾Análise de variância efetuada com resultados transformados em $\sqrt{x+1,0}$, para lesão externa e interna da haste.

⁽³⁾Testemunhas.

Na Tabela 12 estão apresentadas as médias de porcentagem de plântulas mortas (%PM) obtidas em variedades de soja inoculadas com *F. tucumaniae* pelos métodos do palito de dente (PD), disco de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS), em condições de casa de vegetação. De maneira geral, em todos os tratamentos observou-se reação de resistência à *F. tucumaniae*, com exceção de CAC-1 e MG/BR 46 (Conquista), no tratamento em que se empregou o método de inoculação do palito de dente colonizado, que com 28 e 31% de plântulas mortas, respectivamente, caracterizou as cultivares como moderadamente suscetível. Mas como já foi dito os níveis de incidência da doença foram muito baixos nesta época de inoculação.

Tabela 12. Porcentagem de plântulas mortas (%PM)⁽²⁾ obtidas em variedades de soja inoculados com *Fusarium tucumaniae* pelos métodos do palito de dente (PD), disco de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS), em condições de casa de vegetação (primavera/verão).

Variedades	PD		DC		GA		GS	
	%PM	Reação ⁽³⁾	%PM	Reação	%PM	Reação	%PM	Reação
FT-Estrela T ⁽⁴⁾	3 ⁽¹⁾	R	0	---	0	---	0	---
FT-Estrela	25	R	4	R	2	R	0	---
FT-CristalinaT ⁽⁴⁾	0	---	10	R	0	---	0	---
FT-Cristalina	25	R	14	R	6	R	6	R
CAC-1	28	MR	0	---	0	---	0	---
Conquista	31	MR	4	R	4	R	4	R

⁽¹⁾Média de 5 repetições (25 plantas avaliadas)

⁽²⁾%PM = $(PM + PI/2 + PI^2/4)100/TP$, onde: PM = número de plântulas mortas; PI = plântula infectada (com necrose e avermelhamento ao redor do palito, mas com desenvolvimento normal); PI = número de plântulas infectadas; TP = total de plântulas inoculadas (YORINORI, 1996)

⁽³⁾R = Resistente: 0% a 25%PM; MR = Moderadamente Resistente: 26% a 50%PM; MS = Moderadamente Suscetível: 51% a 75%PM; S = Suscetível: 76% a 90%PM; AS = Altamente Suscetível: acima de 90%PM (YORINORI, 1996).

⁽⁴⁾Testemunhas.

Na Tabela 13 estão apresentadas as médias do nível de infecção de raiz de plântulas de soja cultivadas em casa de vegetação (primavera/verão) e inoculadas com *F. tucumaniae*, pelos métodos do palito de dente (PD), discos de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS). Nota-se que para o tratamento em que se utilizou o método do palito de dente, a variedade inoculada FT-Cristalina apresentou diferenças significativas com relação às demais variedades, apresentando maior valor de nível de

infecção. Para o tratamento em que se utilizaram discos de colônia, MG/BR 46 (Conquista) e FT-Cristalina apresentaram maiores níveis de infecção, diferindo significativamente das testemunhas, mas não das outras variedades inoculadas. No método de grãos de aveia FT-Estrela e FT-Cristalina apresentaram maiores níveis de infecção, diferindo significativamente das demais variedades, exceto de MG/BR 46 (Conquista), que por sua vez não diferiu das testemunhas e de CAC-1. Para grãos de sorgo a cultivar MG/BR 46 (Conquista) apresentou maior nível de infecção, diferindo de CAC-1 e das testemunhas, porém não diferiu de FT-Estrela e FT-Cristalina inoculadas. Estas duas cultivares não diferiram das testemunhas e de CAC-1.

Tabela 13. Nível de infecção de raiz⁽²⁾ de plântulas de soja cultivadas em casa de vegetação (primavera/verão) e inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, pelos métodos do palito de dente (PD), disco de colônia (DC), grão de aveia (GA) e grão de sorgo (GS).

Variedades	Nível de infecção de raiz (NIR)			
	PD	DC	GA	GS
FT-Estrela T ⁽⁴⁾	1,00b ⁽¹⁾	1,00b ⁽³⁾	1,00b	1,08b
FT-Estrela	1,12b	1,48ab	1,28a	1,36ab
FT-CristalinaT ⁽⁴⁾	1,00b	1,00b	1,00b	1,00b
FT-Cristalina	1,44a	1,56a	1,32a	1,28ab
CAC-1	1,04b	1,24ab	1,00b	1,24b
Conquista	1,08b	1,52a	1,12ab	1,72a
F	10,42**	4,98**	5,63**	5,45**
C.V. (%)	10,47	19,86	12,41	18,92
dms (5%)	0,23	0,50	0,27	0,47

⁽¹⁾Média de 5 repetições (25 plantas avaliadas)

⁽²⁾Escala de notas que varia de 1 a 3 (onde 1= raiz sem sintoma; 2= raiz pivotante totalmente ou parcialmente necrosada, porém com raízes secundárias normais; 3= sistema radicular totalmente necrosado).

⁽³⁾Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

⁽⁴⁾Testemunhas.

Na Tabela 14 estão apresentadas as médias de massa seca de raiz, de plântulas de soja cultivadas em casa de vegetação (primavera/verão) e inoculadas com *F. tucumaniae*, pelos métodos do palito de dente (PD), discos de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS). Nesta Tabela são apresentadas as análises das cultivares suscetíveis, pois para estas é que se incluíram as testemunhas, já que o

sistema radicular difere de variedade para variedade. Observaram-se diferenças significativas somente nos tratamentos em que se utilizaram os métodos do palito de dente e de grãos de sorgo, para a cultivar FT-Estrela, tendo sempre a variedade inoculada apresentado menor média de massa seca de raiz. Já para a variedade FT-Cristalina os métodos do palito de dente, disco de colônia e grãos de sorgo apresentaram diferenças estatísticas significativas. A variedade inoculada apresentou sempre menor média de massa seca de raiz, diferindo significativamente da testemunha. Se forem analisados os valores da massa seca das raízes entre os tratamentos, nota-se que os valores no método de palito de dente é sempre maior, isto deve ocorrer pelo fato de neste método o inóculo não ser colocado diretamente em contato com o sistema radicular.

Tabela 14. Massa seca de raiz (g) de plântulas de soja cultivadas em casa de vegetação (primavera/verão) e inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, pelos métodos do palito de dente (PD), discos de colônia (DC), grãos de aveia (GA) e grãos de sorgo (GS).

Variedades	Massa seca de raiz (MSR) (g)			
	PD	DC	GA	GS
FT-Estrela T ⁽³⁾	4,92a ⁽¹⁾	2,24a ⁽²⁾	2,45a	3,10a
FT-Estrela	3,45b	2,06a	1,99a	1,89b
F	5,37*	0,29 ^{NS}	1,77 ^{NS}	8,04*
CV(%)	23,87	24,50	25,16	26,93
DMS (5%)	1,46	0,77	0,81	0,98
FT-CristalinaT ⁽³⁾	5,08a	3,16a	2,35a	3,62a
FT-Cristalina	3,27b	1,76b	1,88a	2,55b
F	6,26*	10,74*	0,47 ^{NS}	10,31*
C.V. (%)	27,42	27,62	51,93	17,13
dms (5%)	1,67	0,99	1,60	0,77

⁽¹⁾Média de 5 repetições (25 plantas avaliadas)

⁽²⁾Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

⁽³⁾Testemunhas.

Na Tabela 15 podem ser observados os valores dos coeficientes de correlação entre nível de infecção (NI), severidade dos sintomas foliares (SSF), porcentagem de plântulas mortas (%PM), nível de infecção de raiz (NIR) e massa seca de raiz (MSR), em plântulas de soja inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, para o método do palito de

dente, disco de colônia, grãos de aveia e grãos de sorgo. No método do palito de dente houve correlação positiva e significativa a 1% de probabilidade da %PM com NI e SSF. Entre %PM e MSR houve correlação negativa e significativa a 1% de probabilidade. Também houve correlação positiva e significativa a 5% de probabilidade de NIR com %PM e NI. Correlação negativa e significativa a 5% de probabilidade ocorreu entre MSR com NI e NIR. Para o método de discos de colônia observou-se correlação positiva e significativa a 1% de probabilidade de NI com SSF, %PM e NIR; de SSF com %PM e NIR, e de %PM com NIR. Correlação negativa e significativa a 1% de probabilidade ocorreu entre NI e MSR, indicando que quanto maior o nível de infecção, menor a massa seca de raiz. Para grãos de aveia e de sorgo observou-se correlação positiva e significativa a 1% de probabilidade de SSF com NI e %PM, e de NI com %PM. Para o método de grãos de sorgo ainda houve correlação negativa e significativa a 1% de probabilidade de NIR com MSR, indicando que quanto maior o nível de infecção de raiz, menor a massa seca de raiz.

Tabela 15. Coeficientes de correlação[#] entre níveis de infecção (NI), severidade dos sintomas foliares (SSF), porcentagem de plântulas mortas (%PM), nível de infecção de raiz (NIR) e massa seca de raiz (MSR), em plântulas de soja inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, para o método do palito de dente, disco de colônia, grãos de aveia e grãos de sorgo (primavera/verão).

Palito de dente					
	NI	SSF	%PM	NIR	MSR
NI	---	0,33	0,96** ⁽¹⁾	0,39*	-0,42*
SSF		---	0,52**	-0,11	-0,08
%PM			---	0,35*	-0,49**
NIR				---	-0,39*
MSR					---
Disco de colônia					
NI	---	0,97**	0,85**	0,58**	-0,18
SSF		---	0,85**	0,53**	-0,17
%PM			---	0,55**	-0,03
NIR				---	-0,55**
MSR					---
Grãos de aveia					
NI	---	1,00**	1,00**	0,19	-0,03
SSF		---	1,00**	0,13	0,01
%PM			---	0,13	0,01
NIR				---	-0,24
MSR					---
Grãos de sorgo					
NI	---	0,98**	0,96**	0,15	-0,18
SSF		---	0,98**	0,20	-0,20
%PM			---	0,19	-0,25
NIR				---	-0,60**
MSR					---

[#] Trinta pares de dados correlacionados.

⁽¹⁾** significativo a 1% de probabilidade.

* significativo a 5% de probabilidade.

Em função da PVR apresentar um progresso estritamente relacionado à sua etiologia e epidemiologia, ainda há uma dificuldade para explicar a variação do aparecimento dos sintomas com os fatores ambientais, estágio da cultura e práticas de manejo (SCHERM & YANG, 1996). Este fato decorre do estabelecimento da doença ser influenciado pelas condições de umidade e temperatura do solo. Neste sentido, variações na resistência de cultivares de soja podem ser consideradas situações de escape determinando uma dificuldade adicional no manejo visando ao controle da PVR.

Os dados agrometeorológicos de Jaboticabal retirados de dados históricos no site do INPE/CPTEC 2007 (BRASIL, 2007), do período em que foi inoculado o experimento de primavera/verão 2005/2006, em casa de vegetação, até a última avaliação (média de 47 dias, nos meses de novembro e dezembro de 2005 e janeiro de 2006, dados coletados de 3 em 3 horas) foram os seguintes: temperatura do ar 23,54°C; temperatura máxima 29,49°C; temperatura mínima 19,43°C e umidade relativa do ar 79,56%. No época de outono/inverno 2005 (meses agosto e setembro), obtendo-se como média de 50 dias, dados coletados de 3 em 3 horas, a temperatura do ar foi de 22,26°C, temperatura máxima de 30,13°C, mínima de 15,63°C e umidade relativa de 59,04%. Segundo SCHERM & YANG (1996) condições de alta umidade do solo (cerca de -0,003 a -0,01MPa) e temperaturas amenas foram favoráveis ao desenvolvimento da doença, sendo que temperaturas em torno de 15°C favoreceram o desenvolvimento dos sintomas nas raízes e, entre 22 a 24°C, na parte aérea. Assim, áreas irrigadas ou com maior altitude parecem ser mais sujeitas à incidência da doença. O efeito da temperatura também é importante para a germinação dos macroconídios, a qual não ocorre a 4°C e é maior a 25°C do que a 20 ou 30°C (LI et al., 1998).

Os dados obtidos neste estudo permitem afirmar que no outono/inverno 2005 a amplitude térmica foi maior, e isto deve ter favorecido a maior incidência da doença nesta época do ano quando compara-se com a primavera/verão 2005/2006.

Embora alguns métodos utilizados tenham se mostrado eficientes para avaliar a reação de cultivares de soja à PVR, deve-se levar em consideração que, em função de variáveis ainda não bem conhecidas, os resultados obtidos em casa de vegetação muitas vezes não correspondem aos resultados de campo.

CONCLUSÕES

O estudo de diferentes metodologias de inoculação, em plântulas de soja, visando a caracterização de reações de resistência de cultivares de soja à *F. tucumaniae*, em casa de vegetação – outono/inverno 2005, mostrou-se promissor, pois houve a infecção das plantas, principalmente das variedades suscetíveis, e os sintomas típicos da doença ocorreram em todos os métodos utilizados. Na primavera/verão 05/06, observou-se baixa infecção das plântulas, e os sintomas típicos da doença foram pouco observados nos métodos utilizados, principalmente quando comparados com o experimento montado na época do outono/inverno 2005, que infectou as variedades suscetíveis.

FT-Cristalina apresentou maior nível de infecção da planta e da raiz, menor massa seca de raiz, e maior %PM, dando reação de moderada suscetibilidade, para o método de grãos de sorgo, na época de outono/inverno 05.

No caso das folhas destacadas observou-se que FT-Estrela acondicionada no solo a 23°C, e inoculada pelo método de grãos de aveia, apresentou maior nível de infecção, constituindo-se em método promissor de inoculação.

Pelo estudo tem-se que a melhor época para o desenvolvimento de estudos que envolvam a inoculação de *F. tucumaniae* em soja, em regiões de clima semelhante ao de Jaboticabal/SP, é a do outono/inverno. Na época de primavera/verão, além de não se conseguir a reprodução de sintomas na maioria das plantas inoculadas, tanto de cultivares resistentes como suscetíveis, têm sido constante a ocorrência de ferrugem asiática tanto em condições de casa de vegetação como em folhas destacadas, o que dificulta o desenvolvimento do trabalho e as avaliações dos sintomas.

CAPÍTULO 4. REAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA A *Fusarium tucumaniae* AVALIADAS EM FOLHAS DESTACADAS E EM CASA DE VEGETAÇÃO

RESUMO - Avaliou-se a reação das cultivares de soja, IAS-5, FT-Cometa, CAC-1, Monarca e MG/BR 46 (Conquista) consideradas resistentes, e de FT-Estrela e FT-Cristalina, suscetíveis a *F. tucumaniae*. Foram inoculadas plântulas e folhas destacadas através do método de grãos de sorgo e grãos de aveia, respectivamente, em ambientes de 15°C e 25°C. As avaliações de severidade da doença foram efetuadas semanalmente, utilizando-se escalas de notas tanto para sintomas observados na parte aérea das plântulas como para o sistema radicular, e também através da porcentagem de plântulas mortas. Avaliaram-se também a altura de plantas, comprimento da lesão externa e interna da haste. A relação das cultivares, em ordem crescente de porcentagem de plantas mortas, foi CAC-1 (47%), Monarca (60%), Conquista (61%), IAS-5 (64%), FT-Cristalina (84%), FT-Cometa (86%) e FT-Estrela (90%). Em folhas destacadas, inicialmente, o patógeno infectou tecidos das regiões próximas ao pecíolo, tendo as cultivares Conquista, IAS-5 e FT-Estrela, apresentado maiores níveis de infecção quando mantidas a 25°C.

Palavras-chave adicionais: Síndrome da morte súbita, Podridão Vermelha da raiz, *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, *Glycine max* (L.) Merrill.

INTRODUÇÃO

A podridão vermelha da raiz da soja (PVR) é uma das doenças mais preocupantes dentre as que ocorrem atualmente em soja no Brasil devido à sua dificuldade de controle. A doença é causada por um fungo de solo, *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, que hoje, no Brasil, é denominado como *Fusarium tucumaniae* (EMBRAPA, 2006), e foi observada pela primeira vez no nosso país na safra 1981/82 em São Gotardo - MG (YORINORI et al., 1993). Esta doença tem apresentado crescente aumento em área e severidade desde sua constatação (EMBRAPA, 2006).

O sintoma de infecção na raiz inicia-se com uma mancha avermelhada, mais visível na raiz principal e geralmente localizada um a dois centímetros abaixo do nível do solo. A lesão expande, circundando a raiz que passa a apresentar coloração castanho avermelhado escuro. A necrose situa-se no tecido cortical, enquanto o lenho da raiz adquire uma coloração castanho-clara, estendendo-se pelo tecido lenhoso da haste a vários centímetros acima do nível do solo. A interferência no sistema de absorção e de translocação da água e sais minerais induz a formação do sintoma foliar típico de folha “carijó”, com manchas cloróticas e necróticas internervais (EMBRAPA, 2006). A doença é mais severa em baixas temperaturas e alta umidade (SCHERM & YANG, 1996).

Informações disponíveis até o momento indicam que, com exceção de cultivares resistentes, nenhuma prática agrônômica tem sido adequada para reduzir o impacto da doença. A rotação de cultura com o milho ou a cobertura com milheto não controlam a doença. Além disso, safras chuvosas e semeadura direta favorecem a incidência da doença (EMBRAPA, 2006).

Por ser causada por um fungo de solo e pela expressão dos sintomas ser influenciada pelas condições edáficas e climáticas, muitos pesquisadores têm avaliado a reação de variedades a PVR no próprio campo, instalando experimentos em diversos locais. Outros, porém, têm utilizado diversas metodologias de inoculação artificial e avaliação dos sintomas em ambientes controlados; no entanto, uma metodologia precisa e segura ainda não foi desenvolvida, havendo controvérsias na indicação do

método mais adequado para avaliação de genótipos nos programas de melhoramento visando desenvolver cultivares mais resistentes a PVR (FRONZA, 2003).

O uso de grãos de sorgo colonizados para se proceder à inoculação durante a semeadura tem reduzido a variabilidade dos resultados, tornando possível a realização de análises de rotina em casa de vegetação (RUPE, 1999). Desta forma, este é o método que se apresenta como o mais promissor para a avaliação de genótipos utilizando inoculação artificial (FRONZA, 2003).

A cultura da folha destacada, definida como a manutenção de folhas vivas por um certo período após ter sido destacada da planta mãe (TUIE, 1969; YARWOOD, 1946) é uma técnica que apresenta vantagens quanto à economia de espaço, de material vegetal e de inóculo; facilidade de controle e manipulação de fatores ambientais; redução na contaminação; uniformidade experimental; facilidade e exatidão nas observações, uma vez que se pode examinar o material sob microscópio sem prejudicar a cultura; eliminação quanto à necessidade de luz quando o cultivo é feito em solução de sacarose; crescimento exuberante de alguns parasitas obrigatórios como ferrugem e oídios (HENESSY, 1970; HOOKER, 1966; MIGNUCCI, 1978; TUIE, 1969; YARWOOD, 1946). Assim fitopatologistas começaram a utilizá-la para testes de inoculação e estudos de fisiologia de parasitismo (YARWOOD, 1946).

Mais recentemente, FRANCO (2004) testou a viabilidade da técnica da folha destacada para determinação da reação de genótipos de soja à SMS (síndrome da morte súbita), e obteve resultados que evidenciaram que *F. tucumaniae* infecta a folha destacada enraizada inoculada pelo método do palito de dente, provocando morte do pecíolo e amarelecimento gradual da folha a partir da base. Entretanto o método do palito de dente nem sempre caracterizou a maior suscetibilidade da cultivar FT-Estrela em relação à cultivar MG/BR 46 (Conquista) considerada resistente. O autor concluiu que o emprego da técnica da folha destacada poderá ser promissor nos estudos de determinação de reações de variedades de soja à *F. tucumaniae* com ajustes de metodologia.

Desse modo, no presente trabalho, foram avaliadas metodologias de inoculação artificial do patógeno em folhas destacadas e em plântulas de soja, visando a caracterização da reação das cultivares de soja à *F. tucumaniae*.

MATERIAL E MÉTODOS

1.1. Reação de cultivares de soja a *F. tucumaniae* avaliadas em folhas destacadas

Foram testadas sete cultivares de soja: IAS-5, FT-Cometa, CAC-1, MG/BR 46 (Conquista) consideradas resistentes (EMBRAPA, 2001) e Monarca, também tida como resistente (ABRASEM, 2003), e, FT-Estrela e FT-Cristalina, consideradas suscetíveis (LEÃO et al, 1998; KLINGELFUSS et al, 2001a; KLINGELFUSS et al., 2007; FRONZA, 2003) a *Fusarium solani* f. sp. *glycines*.

Folhas de soja foram destacadas de plântulas cultivadas em casa de vegetação até o estágio V1 (FEHR & CAVINESS, 1977) e acondicionadas em placas de Petri contendo mistura de terra, areia e vermiculita (proporção 12:4:2). A calagem e adubação dessa mistura foi feita de acordo com as recomendações de MALAVOLTA (1980). A coleta das plantas foi efetuada no final da tarde conforme recomendação de TUIE (1969). No laboratório, as folhas foram destacadas da planta, cortando-se o pecíolo imerso em água destilada com auxílio de tesoura, sendo em seguida colocadas em placas de Petri contendo cerca de 50 mL de terra umedecida com 20 mL de água destilada. O pecíolo das folhas foi introduzido no solo e uma lâmina de vidro foi utilizada para evitar o contato do limbo foliar com a terra. Sob as tampas das placas de Petri foi colocado plástico transparente para manutenção da umidade da terra.

Para o preparo do meio de cultura, discos de colônia de *F. tucumaniae* em BDA, foram transferidos para meio de grãos de aveia, em torno de dez dias antes de se realizar a inoculação em folhas destacadas. Este procedimento foi semelhante ao proposto por LIM (1991), que utilizou grãos de aveia, seguindo-se as modificações efetuadas por HARTMAN et al. (1997) e BALARDIN & RUBIN (1999), que utilizaram grãos de sorgo. Foram utilizados erlenmeyers de 250 mL, onde foram colocados cerca de 100 cm³ de grãos de aveia previamente embebidos em água. A embebição foi efetuada durante 2 horas, sendo a água restante eliminada e os frascos contendo as

sementes embebidas autoclavados duas vezes, durante 20 minutos a 120°C, com intervalo de 24 horas. Após o resfriamento, para cada erlenmeyer foram transferidos 15 discos de 5 mm de diâmetro de colônias do fungo em BDA. Em seguida adicionaram-se 10 mL de água destilada estéril para promover melhor dispersão dos esporos e micélio e umedecimento dos grãos de aveia. Para promover o crescimento uniforme do micélio do fungo em torno dos grãos de aveia e para manter os grãos soltos, foram agitados periodicamente (a cada dois a três dias). Os frascos contendo o fungo foram incubados em câmara de germinação a 24°C, e fotoperíodo de 12 horas. Na inoculação foram utilizados dois grãos de aveia, colocados em posição oposta encostados à região do pecíolo das folhas destacadas, com auxílio de uma pinça.

Após inoculação as folhas destacadas foram incubadas em câmaras de germinação com temperaturas ajustadas para 15°C e 25°C e fotoperíodo de 12h.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 10 repetições, sendo cada parcela constituída por uma placa de Petri contendo duas folhas destacadas. Foram incluídas testemunhas não inoculadas apenas para as cultivares suscetíveis.

Foram realizadas três avaliações, aos 13, 21 e 27 dias após a inoculação, empregando-se escala de notas de 0 a 5 proposta por YORINORI (1997a) para avaliação do nível de infecção (NI) de doenças foliares, em que: 0 = sem sintomas; 1 = traços a 10% de área foliar infectada (AFI); 2 = 11 a 25% AFI; 3 = 26 a 50% de AFI; 4 = 51 a 75% AFI; 5 = 76 a 100% AFI.

1.2. Reação de cultivares de soja a *F. tucumaniae* avaliadas em plântulas

Para este ensaio em casa de vegetação foram testadas as mesmas sete cultivares de soja utilizadas no ensaio com folhas destacadas.

O cultivo foi efetuado em vasos contendo a mistura de terra, areia e vermiculita (proporção 15:2:1), calcareada e adubada de acordo com recomendações de MALAVOLTA (1980) para a cultura da soja. A inoculação foi efetuada através do método de grãos de sorgo colonizados pelo patógeno. O preparo dos grãos de sorgo foi semelhante ao descrito para o preparo de grãos de aveia no item anterior (1.1). A

inoculação foi realizada no momento da semeadura, colocando-se no fundo de cada cova (± 3 cm de profundidade) cinco grãos de sorgo colonizados com o patógeno. Estes foram cobertos com uma camada de solo de cerca de 1 cm e, em seguida, semeou-se a soja. Desta forma, os grãos de sorgo ficaram 1 cm abaixo das sementes de soja, evitando-se o contato direto destas com o inóculo. Aos 15 dias após a emergência, após o encharcamento do solo, foi efetuada outra inoculação, pressionando-se dois grãos de sorgo colonizados (a cerca de 1 cm de profundidade), com o auxílio de um bastão de vidro, junto à região do colo de cada planta e em posição oposta (FRONZA, 2003).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com dez repetições, sendo a parcela constituída por um vaso com cinco plântulas. Testemunhas não inoculadas foram efetuadas apenas nas cultivares suscetíveis.

A primeira avaliação dos sintomas foi efetuada 15 dias após a inoculação, simultaneamente à segunda inoculação, e as cinco avaliações seguintes foram realizadas semanalmente, através de escala de notas de 0 a 5, proposta por YORINORI (1997a), e adaptada por FRANCO (2004).

A avaliação também foi efetuada através da escala de notas baseada na severidade dos sintomas foliares utilizada por HARTMAN et al. (1997) e modificada por FRONZA (2003).

Também avaliou-se a porcentagem de plântulas mortas, contando-se plântulas saudáveis, plântulas infectadas (PI) e plântulas mortas (PM). O critério de separação da reação das variedades baseou-se na porcentagem de plântulas mortas (%PM). O cálculo da porcentagem de plântulas mortas foi feito utilizando a seguinte fórmula: $\%PM = (PM + PI/2)100/TP$, onde: PM = número de plântulas mortas; PI = número de plântulas infectadas; TP = total de plântulas inoculadas. A reação das variedades foi discriminada em cinco categorias, conforme a porcentagem de plântulas mortas (%PM), de acordo com o seguinte critério: R = Resistente: 0% a 25%PM; MR = Moderadamente Resistente: 26% a 50%PM; MS = Moderadamente Suscetível: 51% a 75%PM; S = Suscetível: 76% a 90%PM; AS = Altamente Suscetível: acima de 90%PM. Esta forma de

avaliação da reação de plântulas a *F. tucumaniae* foi baseada na proposta de YORINORI (1996) para avaliação do cancro da haste.

Após esta avaliação de reação de plântulas, foi medida a altura das plantas e o comprimento da lesão externa e interna da haste, com auxílio de uma régua graduada. Realizou-se também a avaliação dos sintomas presentes na raiz, através de uma escala de notas de 1 a 3 (onde 1= raiz sem sintoma; 2= raiz pivotante total ou parcialmente necrosada, porém com raízes secundárias normais; 3= sistema radicular totalmente necrosado). Para isso efetuou-se a lavagem das raízes em água corrente, em seguida a avaliação visual e posteriormente a secagem em estufa, para obtenção da massa seca da raiz por parcela experimental.

2. Análises estatísticas dos resultados

Os resultados obtidos, em casa de vegetação e folhas destacadas, foram submetidos a análises de variância pelo teste F, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No experimento com folhas destacadas utilizou-se o esquema fatorial 9 x 2 com nove tratamentos (sete cultivares + duas testemunhas representadas por duas cultivares suscetíveis não inoculadas) e duas temperaturas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.1. Reação de cultivares de soja a *F. tucumaniae* avaliadas em folhas destacadas

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados do nível de infecção de *F. tucumaniae* obtidos em folhas destacadas de sete cultivares de soja inoculadas pelo método de grãos de aveia, incubadas em solo em duas temperaturas. Observou-se que na terceira avaliação as cultivares inoculadas não diferiram significativamente entre si, apenas das testemunhas. Houve amarelecimento de algumas testemunhas, o que dificultou a interpretação dos resultados. Embora a folha de soja sobreviva e enraíze em alto percentual, pode ocorrer morte prematura, sem que se consiga detectar a causa,

que permita fazer os devidos ajustes para futuros ensaios. Como relatado por YARWOOD (1946) uma das desvantagens do método da folha destacada é a baixa sobrevivência das folhas. Com relação a temperatura, a que favoreceu o desenvolvimento dos sintomas da doença foi a de 25°C, desde a primeira até a terceira avaliação.

Tabela 1. Nível de infecção⁽¹⁾ de *Fusarium tucumaniae* obtidos em folhas destacadas, de sete cultivares de soja inoculadas pelo método de grãos de aveia e incubadas em solo em duas temperaturas.

Tratamentos (A)	1ª Avaliação 13 DAÍ ⁽²⁾	2ª Avaliação 21 DAÍ	3ª Avaliação 27 DAÍ
CAC-1	1,95ab ⁽³⁾	2,90ab	3,08ab
Conquista	2,45a	3,48a	3,93a
FT-Cometa	2,38a	3,08a	3,48a
Monarca	1,95ab	2,98a	3,53a
FT-Estrela T ⁽⁵⁾	1,60b	2,23b	2,33b
FT-Estrela	2,48a	3,20a	3,45a
FT-Cristalina T ⁽⁵⁾	0,25c	1,00c	1,23c
FT-Cristalina	2,37a	3,15a	3,45a
IAS-5	2,55a	3,58a	4,00a
F ⁽⁴⁾	22,23**	16,90**	17,71**
dms (5%)	0,24	0,28	0,29
Temperatura (B)			
15°C	1,42b	2,07b	2,45b
25°C	2,57a	3,61a	3,87a
F ⁽⁴⁾	88,74**	92,83**	72,55**
dms (5%)	0,07	0,82	0,08
Interações			
Teste F A x B	7,73**	3,77**	3,69**
C.V. (%)	14,11	14,57	14,37

⁽¹⁾Médias (de 10 repetições) apresentadas em escala original, de 0 a 5 (proposta por YORINORI (1997a)), onde 0 = sem sintomas; 1 = traços a 10% de área foliar infectada (AFI); 2 = 11 a 25% AFI; 3 = 26 a 50% de AFI; 4 = 51 a 75% AFI; 5 = 76 a 100% AFI.

⁽²⁾DAI = Dias após a inoculação

⁽³⁾Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

⁽⁴⁾Análise de variância efetuada com resultados transformados em $\sqrt{x + 1,0}$.

⁽⁵⁾Testemunhas

Na Tabela 2, em que se apresenta a interação tratamentos dentro de temperaturas na primeira, segunda e terceira avaliações, pode-se notar que, na primeira avaliação, o nível de infecção em folhas destacadas, para a maioria das

variedades testadas, foi superior em ambiente a 25°C. Analisando-se tratamentos dentro de cada temperatura percebeu-se que a 15°C, FT-Cometa apresentou maior média de nível de infecção, porém não diferiu significativamente das demais cultivares, exceto das testemunhas. A 25°C, FT-Estrela foi mais afetada, mas diferiu significativamente apenas da cultivar Monarca e da testemunha FT-Cristalina. Na segunda e terceira avaliação, pode-se notar que o nível de infecção em folhas destacadas, para a maioria das variedades testadas, foi superior em ambiente a 25°C, assim como ocorrido na primeira avaliação. Quando se analisa tratamentos dentro de cada temperatura percebe-se que a 15°C, IAS-5 apresentou maior média de nível de infecção, porém não diferiu significativamente das demais cultivares, exceto das testemunhas. A 25°C, FT-Estrela, IAS-5 e MG/BR 46 (Conquista) apresentaram médias superiores de nível de infecção, porém só diferiram significativamente da testemunha FT-Cristalina.

Tabela 2. Nível de infecção⁽¹⁾ de *Fusarium tucumaniae* em folhas destacadas de soja, na interação de tratamentos dentro de temperaturas na primeira, segunda e terceira avaliações.

Tratamento (A)	Temperaturas (B)								
	1ª Av.		F	2ª Av.		F	3ª Av.		F
	15°C	25°C		15°C	25°C		15°C	25°C	
CAC-1	1,45Ba ⁽²⁾	2,45Aab	7,72**	2,35Ba	3,45Aa	4,55*	2,60Aa	3,55Aab	2,86 ^{NS}
Conquista	2,00Ba	2,90Aab	5,46*	2,75Ba	4,20Aa	7,64**	3,25Ba	4,60Aa	5,85*
FT-Cometa	2,25Aa	2,50Aab	0,50 ^{NS}	2,80Aa	3,35Aa	1,10 ^{NS}	3,15Aa	3,80Aa	1,42 ^{NS}
Monarca	1,85Aa	2,05Ab	0,19 ^{NS}	2,50Aa	3,45Aa	3,47 ^{NS}	3,20Aa	3,85Aa	1,32 ^{NS}
FT-Estrela T ⁽⁴⁾	0,00Bb	3,20Aab	87,15**	0,60Bb	3,85Aa	53,16**	0,80Bb	3,85Aab	43,38**
FT-Estrela	1,35Ba	3,60Aa	33,14**	2,15Ba	4,25Aa	16,15**	2,60Ba	4,30Aa	9,54**
FT-Cristalina T ⁽⁴⁾	0,00Ab	0,50Ac	2,95 ^{NS}	0,00Bb	2,00Ab	25,80**	0,10Bb	2,35Ab	29,80**
FT-Cristalina	1,85Ba	2,90Aab	6,82**	2,60Ba	3,70Aa	4,46*	2,95Aa	3,95Aa	3,17 ^{NS}
IAS-5	2,05Ba	3,05Aab	6,67*	2,90Ba	4,25Aa	6,72*	3,40Ba	4,60Aa	4,78*
F ⁽³⁾	16,52**	13,44**		15,58**	5,11**		17,17**	4,24**	
dms A dentro B			0,21			0,39			0,40
dms B dentro de A			0,33			0,25			0,25

⁽¹⁾Médias (de 10 repetições) do nível de infecção em escala original, de 0 a 5 (proposta por YORINORI (1997a)), onde 0 = sem sintomas; 1 = traços a 10% de área foliar infectada (AFI); 2 = 11 a 25% AFI; 3 = 26 a 50% de AFI; 4 = 51 a 75% AFI; 5 = 76 a 100% AFI.

⁽²⁾Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

⁽³⁾ Análise de variância efetuada com resultados transformados em $\sqrt{x + 1,0}$.

⁽⁴⁾Testemunhas.

1.2. Reação de cultivares de soja a *F. tucumaniae* avaliadas em plântulas

1.2.1. Avaliação dos sintomas da parte aérea

Nível de infecção (NI)

Na Figura 1 estão apresentados os resultados de avaliações do nível de infecção (NI) de variedades de soja cultivadas no outono/inverno, em condições de casa de vegetação inoculadas com *F. tucumaniae*, pelo método de grãos de sorgo (GS) colonizados, e os dados analisados, da sexta avaliação, estão apresentados na Tabela 3. Na 1ª avaliação, efetuada aos 15 dias após a inoculação, não foram observados sintomas foliares da doença. No decorrer de seis semanas de avaliações, verificou-se evolução dos sintomas, sendo que na 6ª avaliação, observaram-se diferenças estatísticas significativas entre as cultivares inoculadas, tendo as cultivares FT-Estrela, FT-Cristalina e FT-Cometa atingido as maiores médias de níveis de infecção, e CAC-1 a menor. Um aspecto importante deve ser ressaltado. No decorrer da experimentação, foi observado que as condições climáticas do município de Jaboticabal, na época de outono/inverno, favoreceram a manifestação da doença. Analisando-se os resultados da 3ª a 6ª avaliação, verificou-se que a evolução dos sintomas das cultivares classificadas como resistentes foi mais lenta do que naquelas classificadas como suscetíveis. Essa tendência foi confirmada na 6ª avaliação onde pode-se observar maiores níveis de resistência em CAC-1 e Monarca, e maior suscetibilidade em FT-Estrela e FT-Cristalina.

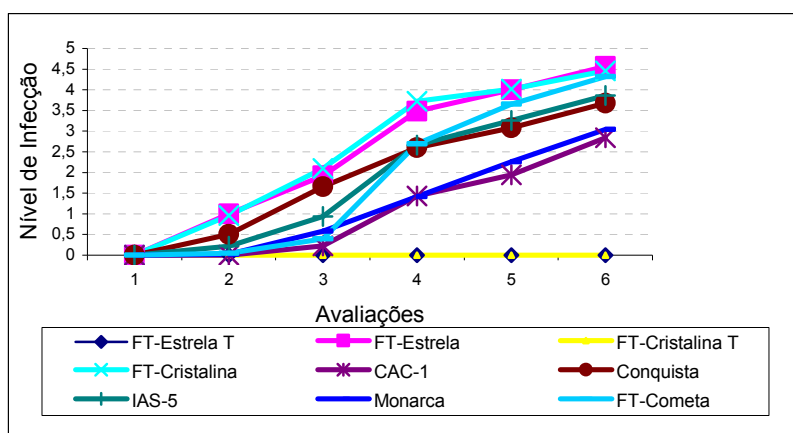


Figura 1. Nível de infecção (NI), de *Fusarium tucumaniae* obtido em variedades de soja cultivadas no outono/inverno em condições de casa de vegetação, inoculadas pelo método de grãos de sorgo (GS) colonizados.

Severidade dos sintomas foliares (SSF)

Na Figura 2 estão apresentados os resultados das avaliações da severidade dos sintomas foliares (SSF) de variedades de soja cultivadas no outono/inverno 2006 em condições de casa de vegetação inoculadas com *F. tucumaniae*, pelo método de grãos de sorgo (GS) colonizados, e os dados analisados, da sexta avaliação, estão apresentados na Tabela 3. Os resultados obtidos através deste método de avaliação foram semelhantes aos anteriormente apresentados na Figura 1, confirmando a tendência de maior nível de resistência nas cultivares Monarca e CAC-1, e maior suscetibilidade em FT-Estrela e FT-Cristalina.

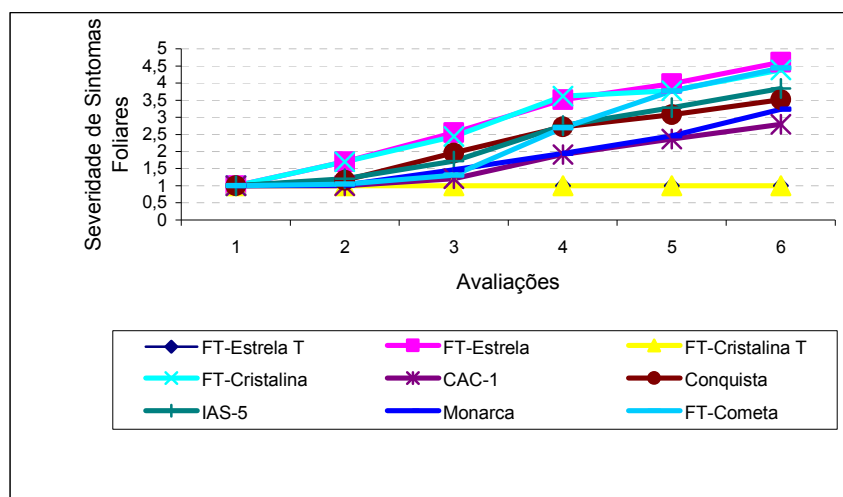


Figura 2. Severidade dos sintomas foliares (SSF), de *Fusarium tucumaniae* em variedades de soja cultivadas no outono/inverno em condições de casa de vegetação, inoculadas pelo método de grãos de sorgo (GS) colonizados.

Tabela 3. Severidade dos sintomas foliares (SSF)⁽¹⁾ e nível de infecção (NI)⁽²⁾ de *Fusarium tucumaniae* obtidos na sexta avaliação, em variedades de soja cultivadas no outono/inverno em condições de casa de vegetação, inoculadas pelo método de grãos de sorgo (GS) colonizados.

6ª avaliação (57 dias após a inoculação)	SSF	NI
Variedades		
CAC-1	2,79c	2,70c ^{(3),(4)}
Conquista	3,52bc	3,68ab
FT-Cometa	4,44a	4,32a
Monarca	3,24bc	3,04bc
FT-Estrela T ⁽⁵⁾	1,00d	0,00d
FT-Estrela	4,61a	4,57a
FT-Cristalina T ⁽⁵⁾	1,00d	0,00d
FT-Cristalina	4,38a	4,46a
IAS-5	3,84ab	3,86ab
Teste F	53,13**	73,64**
C.V. (%)	18,72	22,29
dms (5%)	0,85	0,94

⁽¹⁾ Severidade dos sintomas foliares avaliado através de escala de notas de 1 a 5 (proposta por HARTMAN et al. (1997) e modificada por FRONZA (2003)) sendo que : 1=ausência de sintomas foliares visíveis; 2=leve desenvolvimento dos sintomas, com clorose em mosaico, e deformação ou encarquilhamento dos folíolos; 3=moderado desenvolvimento dos sintomas, com clorose internerval e necrose na borda dos folíolos; 4=elevado desenvolvimento dos sintomas, com clorose e necrose internerval (até 50% de área foliar afetada por necrose); 5=severo desenvolvimento dos sintomas, com clorose e necrose internerval e/ou plantas mortas ou severa restrição no desenvolvimento das plantas (51 a 100% de área foliar afetada por necrose).

⁽²⁾ Nível de infecção avaliado através de escala de notas de 0 a 5 (proposta por YORINORI (1997a), e adaptada por FRANCO (4)), sendo que : 0 = planta sem sintomas; 1 = traços a 10% da planta infectada(PI); 2 = 11 a 25% da PI; 3 = 26 a 50% da PI; 4 = 51 a 75% da PI e 5 = 76 a 100% da PI.

⁽³⁾ Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

⁽⁴⁾ Média de 10 repetições (50 plantas avaliadas/cultivar).

⁽⁵⁾ Testemunhas.

Porcentagem de plântulas mortas (%PM)

Na Tabela 4 estão apresentadas as médias de porcentagem de plântulas mortas (%PM) obtidas em variedades de soja inoculados com *F. tucumaniae* pelo método de grãos de sorgo (GS), em condições de casa de vegetação. A cultivar FT-Estrela apresentou reação de alta suscetibilidade (90,25%PM), FT-Cometa e FT-Cristalina se comportaram como suscetíveis. IAS-5, Monarca e Conquista apresentaram reação de

moderada suscetibilidade. CAC-1, com 46,89% de plântulas mortas, foi caracterizada como moderadamente resistente.

Em São Gotardo, na safra 1991/92, foi observado variação na expressão do sintoma foliar entre duas cultivares. A "UFV-10" apresentou 100% das plantas infectadas com folha "carijó", enquanto a "CAC-1" apresentou apenas amarelecimento prematuro das folhas, com raras ocorrências de folha "carijó" (YORINORI, 1997b).

Através de inoculações artificiais (palito de dente e suspensão de micélio + esporos) YORINORI & NOMURA (1994) apresentaram CAC-1 como moderadamente resistente, assim como EMBRAPA (2001) e LEÃO et al (1998), também apresentaram esta cultivar como uma das mais tolerantes a PVR.

LEÃO et al. (1998) e FRONZA (2003) também verificaram que FT-Estrela e FT-Cristalina se comportaram como mais suscetíveis a PVR.

A cultivar FT-Estrela apresentou reação de suscetibilidade em trabalho apresentado por KLINGELFUSS et al. (2007).

Lesão interna (LI), e Lesão externa (LE) e altura de plântula (AL)

As comparações de médias de comprimento (cm) da lesão externa (LE) e lesão interna (LI) também estão apresentadas na Tabela 4, onde se pode observar que houve diferenças estatísticas significativas entre os resultados obtidos para as cultivares inoculadas e testemunhas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A cultivar FT-Estrela apresentou maior lesão externa da haste, não diferindo de FT-Cometa, IAS-5, e FT-Cristalina, porém diferiu de Monarca (menor lesão externa), Conquista e CAC-1. Com relação a LI, FT-Cometa e FT-Estrela apresentaram as maiores médias, e não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A cultivar Monarca apresentou a menor LI, e não diferiu significativamente de CAC-1, FT-Cristalina, IAS-5 e Conquista.

Tabela 4. Porcentagem de plântulas mortas (%PM)⁽²⁾, comprimento (cm) da lesão externa (LE) e lesão interna (LI) obtidas em variedades de soja inoculadas com *Fusarium tucumaniae* pelo método de grãos de sorgo(GS), em condições de casa de vegetação (outono/inverno).

Variedades	%PM	Reação ⁽³⁾	LE	LI
CAC-1	46,89 ⁽¹⁾	MR	4,01bcd ⁽⁴⁾	10,27c
Conquista	61,00	MS	4,73bcd	16,56bc
FT-Cometa	86,00	S	11,40ab	29,20a
Monarca	60,00	MS	2,03cd	9,99c
FT-Estrela T ⁽⁶⁾	0,00	---	0,00d	0,00d
FT-Estrela	90,25	AS	12,39a	20,47ab
FT-Cristalina T ⁽⁶⁾	0,00	---	0,00d	0,00d
FT-Cristalina	84,00	S	7,73abc	16,17bc
IAS-5	64,00	MS	9,11abc	16,49bc
Teste F ⁽⁵⁾			8,80**	34,61**
C.V. (%)			44,99	24,02
dms (5%)			1,43	1,17

⁽¹⁾Média de 10 repetições (50 plantas avaliadas/cultivar)

⁽²⁾%PM = (PM + PI/2)100/TP, onde: PM = número de plântulas mortas; PI = número de plântulas infectadas; TP = total de plântulas inoculadas (proposta de YORINORI (1996) para avaliação do cancro da haste)

⁽³⁾R = Resistente: 0% a 25%PM; MR = Moderadamente Resistente: 26% a 50%PM; MS = Moderadamente Suscetível: 51% a 75%PM; S = Suscetível: 76% a 90%PM; AS = Altamente Suscetível: acima de 90%PM (proposta de YORINORI (1996) para avaliação do cancro da haste).

⁽⁴⁾Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

⁽⁵⁾Análise de variância efetuada com resultados transformados em $\sqrt{x + 1,0}$.

⁽⁶⁾Testemunhas.

Como a altura de plantas é uma característica agrônômica que varia de uma cultivar para outra, são apresentadas na Tabela 5, apenas as análises das cultivares suscetíveis, pois para estas é que se incluíram as testemunhas. As testemunhas apresentaram média de altura de plantas superior as inoculadas, diferindo significativamente a 5% de probabilidade, indicando que a infecção das plantas por *F. tucumaniae* foi efetiva e provocou paralização ou redução drástica no desenvolvimento das plantas. Para HERSHMAN et al. (1990) e MELGAR & ROY (1994) a altura das plantas parece não ser afetada pela SMS. Entretanto, reduções da altura ocorreram (McLEAN & LAWRENCE, 1993) em plantas inoculadas artificialmente em casa de vegetação (ROY et al., 1989).

Tabela 5. Altura (cm) (AL) de plântulas de soja cultivadas em casa de vegetação (outono/inverno) inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, pelo método de grãos de sorgo (GS).

Variedades	AL (cm)
FT-Estrela T ⁽³⁾	66,03a ^{(1),(2)}
FT-Estrela	32,71b
Teste F	101,84**
C.V. (%)	14,96
dms (5%)	6,93
FT-Cristalina T ⁽³⁾	88,14a
FT-Cristalina	29,15b
Teste F	277,20**
C.V. (%)	13,51
dms (5%)	7,44

⁽¹⁾Média de 10 repetições (50 plantas avaliadas/cultivar).

⁽²⁾Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

⁽³⁾Testemunhas.

1.2.2. Avaliação dos sintomas no sistema radicular

Na Tabela 6 estão apresentadas as médias do nível de infecção de raiz de plântulas de soja cultivadas em casa de vegetação (outono/inverno) e inoculadas com *F. tucumaniae*, pelo método de grãos de sorgo (GS). Pode-se notar que a infecção foi efetiva nas variedades inoculadas, todas diferiram significativamente das testemunhas, tendo FT-Cristalina, FT-Estrela e FT-Cometa apresentado maiores médias de níveis de infecção radicular, e não diferiram significativamente entre si. CAC-1 foi a mais resistente, mas não diferiu de Conquista, Monarca e IAS-5.

Na Tabela 7 estão apresentadas as médias de massa seca de raiz, de plântulas de soja cultivadas em casa de vegetação (outono/inverno) e inoculadas com *F. tucumaniae*, pelo método de grãos de sorgo (GS). Nesta Tabela são apresentadas as análises das cultivares suscetíveis, pois para estas é que se incluíram as testemunhas, já que o sistema radicular difere de variedade para variedade. Observaram-se diferenças estatísticas significativas entre as cultivares inoculadas e suas testemunhas, tendo as plântulas inoculadas apresentado menor média de massa seca de raiz, diferindo significativamente da testemunha. A expressão dos sintomas foliares da PVR com certeza está relacionada ao grau de destruição do sistema radicular das plantas

infectadas, prejudicando a absorção de água e nutrientes e também sua posterior translocação para a parte aérea, pelos danos causados ao sistema vascular na parte inferior das plantas.

Tabela 6. Nível de infecção de raiz⁽¹⁾ de plântulas de soja cultivadas em casa de vegetação (outono/inverno) e inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, pelo método de grãos de sorgo (GS).

Variedades	NIR
CAC-1	2,56c ⁽²⁾
Conquista	2,62bc
FT-Cometa	2,80ab
Monarca	2,56c
FT-Estrela T ⁽³⁾	1,00d
FT-Estrela	2,85ab
FT-Cristalina T ⁽³⁾	1,00d
FT-Cristalina	2,86a
IAS-5	2,72abc
F	216,07**
C.V. (%)	7,04
dms (5%)	0,23

⁽¹⁾Escala de notas que varia de 1 a 3 (onde 1= raiz sem sintoma; 2= raiz pivotante totalmente ou parcialmente necrosada, porém com raízes secundárias normais; 3= sistema radicular totalmente necrosado).

⁽²⁾Médias (de 10 repetições (50 plantas avaliadas/cultivar)) seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

⁽³⁾Testemunhas.

Tabela 7. Massa seca de raiz (g) de plântulas de soja cultivadas em casa de vegetação (outono/inverno) inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, pelo método de grãos de sorgo (GS).

Variedades	MSR (g)
FT-Estrela T ⁽²⁾	1,06a ⁽¹⁾
FT-Estrela	0,26b
F	115,73**
C.V. (%)	25,27
dms (5%)	0,1568
FT-Cristalina T ⁽²⁾	0,98a
FT-Cristalina	0,25b
F	92,13**
C.V. (%)	27,21
dms (5%)	0,1602

⁽¹⁾Médias (de 10 repetições (50 plantas avaliadas/cultivar)) seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

⁽²⁾Testemunhas.

1.2.3. Análises de correlação

Na Tabela 8 podem ser observados os valores dos coeficientes de correlação entre nível de infecção (NI), severidade dos sintomas foliares (SSF), porcentagens de plântulas mortas (%PM), nível de infecção de raiz (NIR), massa seca de raiz (MSR), altura de plantas (AL), lesão externa na haste (LE) e lesão interna na haste (LI), em plântulas de soja inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, para o método de grãos de sorgo. Observou-se correlação significativa a 1% de probabilidade entre quase todos os dados analisados, porém a correlação foi negativa entre MSR e NI, SSF, %PM, NIR, LE e LI, indicando que quanto menor a massa seca de raiz, maior será o nível de infecção, a severidade de sintomas foliares, a %plântulas mortas, o nível de infecção de raiz, a lesão externa e interna da haste; entre AL e NI, SSF, %PM, NIR, LE e LI, mostrando que quanto menor a altura de plantas, maior será o nível de infecção, a severidade de sintomas foliares, a %plântulas mortas, o nível de infecção de raiz, a lesão externa e interna da haste.

Tabela 8. Coeficientes de correlação[#] entre nível de infecção (NI), severidade dos sintomas foliares (SSF), porcentagem de plântulas mortas (%PM), níveis de infecção de raiz (NIR), massa seca de raiz (MSR), altura de plantas (AL), lesão externa na haste (LE) e lesão interna na haste (LI), em plântulas de soja inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, para o método de grãos de sorgo.

	NI	SSF	%PM	NIR	MSR	AL	LE	LI
NI	---	0,98** ⁽¹⁾	0,96**	0,94**	-0,87**	-0,83**	0,58**	0,81**
SSF		---	0,96**	0,89**	-0,84**	-0,84**	0,62**	0,83**
%PM			---	0,91**	-0,84**	-0,80**	0,59**	0,79**
NIR				---	-0,92**	-0,76**	0,51**	0,72**
MSR					---	0,76**	-0,50**	-0,67**
AL						---	-0,56**	-0,66**
LE							---	0,72**
LI								---

[#] Noventa pares de dados correlacionados.

^{(1)**} significativo a 1% de probabilidade.

* significativo a 5% de probabilidade.

Na Tabela 9 estão apresentados os coeficientes de correlação dos níveis de infecção de *Fusarium tucumaniae* entre casa de vegetação (NI CV) e folha destacada a 15°C (NI FD 15°C) e folha destacada a 25°C (NI FD 25°C), analisando-se as variedades em conjunto. Houve correlação positiva e significativa a 1% de probabilidade entre nível de infecção foliar em casa de vegetação e folhas destacadas, tanto a 15 quanto a 25°C, quando se analisam as cultivares conjuntamente, porém a correlação foi maior na temperatura de 15°C.

Tabela 9. Coeficientes de correlação[#] entre nível de infecção em casa de vegetação (NI CV), em folha destacada a 15°C (NI FD 15°C) e folha destacada a 25°C (NI FD 25°C), em plântulas de soja inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, para o método de grãos de sorgo.

	NI CV	NI FD 15°C	NI FD 25°C
NI CV	---	0,69** ⁽¹⁾	0,32**
NI FD 15°C		---	0,53**
NI FD 25°C			---

[#] Noventa pares de dados correlacionados.

^{(1)**} significativo a 1% de probabilidade.

* significativo a 5% de probabilidade.

1.2.4. Considerações finais

A inoculação pelo método de grãos de sorgo, em plântulas de soja, visando a caracterização de reação de resistência de cultivares de soja à *F. tucumaniae*, em casa de vegetação – outono/inverno 2006, resultou em infecção das plantas, e os sintomas típicos da doença foram observados, tendo FT-Estrela alcançado a maior porcentagem de plantas mortas (90,25%).

A expressão dos sintomas foliares da PVR deve estar relacionada com o grau de destruição do sistema radicular das plantas infectadas, prejudicando a absorção de água e nutrientes e também sua posterior translocação para a parte aérea, pelos danos causados ao sistema vascular na parte inferior das plantas (FRONZA, 2003). As cultivares FT-Cristalina, FT-Estrela e FT-Cometa, no experimento de casa de vegetação, apresentaram maiores médias de níveis de infecção radicular (Tabela 6), maiores níveis de infecção foliar (NI) (Figura 1, Tabela 3) e maiores níveis de severidade de sintomas foliares (SSF) (Figura 2, Tabela 3). Segundo NJITI et al.

(1997a), tanto as raízes de cultivares suscetíveis quanto aquelas de cultivares resistentes são infectadas pelo patógeno, porém, a taxa de infecção e o desenvolvimento dos sintomas foram menores nas variedades resistentes.

No caso das folhas destacadas inoculadas pelo método de grãos de aveia, observou-se que *F. tucumaniae* infectou as folhas inoculadas, provocando amarelecimento gradual da folha a partir da base, tendo maiores níveis de infecção as cultivares Conquista, IAS-5 e FT-Estrela acondicionada a 25°C. Entretanto, houve amarelecimento de algumas testemunhas o que leva a pensar que este método, ou não é tão seguro ou necessita de ajustes de metodologia, para que a avaliação da reação de cultivares de soja à doença tenha resultados mais precisos. As hipóteses que se pode levantar para o fato ocorrido seriam um amarelecimento por senescência precoce das folhas, o estado nutricional no momento da coleta das folhas e a influência varietal.

Houve correlação positiva e significativa a 1% de probabilidade entre nível de infecção foliar em casa de vegetação e folhas destacadas, tanto a 15 quanto a 25°C, porém, esta correlação foi maior na menor temperatura.

CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos, a melhor época e método para o desenvolvimento de estudos que envolvam a inoculação de *F. tucumaniae* em soja, em regiões de clima semelhante ao de Jaboticabal/SP, é a do outono/inverno, utilizando-se o método de grãos de sorgo colonizado pelo patógeno. No método da folha destacada ocorre infecção de *F. tucumaniae*, porém, não foi possível caracterizar reação das cultivares estudadas.

REFERÊNCIAS

- ACHENBACH, L. A.; PATRICK, J.; GRAY, L. Genetic homogeneity among isolates of *Fusarium solani* that cause soybean sudden death syndrome. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, p 474-478, 1997.
- ACHENBACH, L. A.; PATRICK, J.; GRAY, L. Use of RAPD markers as a diagnostic tool for the identification of *Fusarium solani* isolates that cause soybean sudden death syndrome. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, p. 1228-1232, 1996.
- ALMEIDA, A. M. R. et al. Doenças da soja (*Glicine max* L.) In : KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres., 1997. v.2, p.642-664.
- ALVES, G. M. R.; COBUCCI, T. Esporulação de *Fusarium* sp. em substratos naturais e sintéticos para a produção massal desse micoherbicida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 23, 2002, Gramado. Resumos, p. 247.
- ANDERSON, T. R. et al. First report of *Fusarium solani* f.sp. *glycines* causing sudden death syndrome of soybean in Canada. **Plant Disease**, St. Paul, v.82, n.4, p.448, 1998.
- AOKI, T. et al. Four *Fusarium* species cause soybean sudden death syndrome. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7.; INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE, 4.; CONGRESSO MUNDIAL DE SOJA (BRAZILIAN SOYBEAN CONGRESS), 3., 2004, Foz do Iguaçu. **Proceedings...** Londrina: Embrapa Soja, 2004. p.615-618.
- AOKI, T. et al. Sudden death syndrome of soybean is caused by two morfologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex, *F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. **Mycologia**, Bronx, v.95, p.660-684, 2003.
- AOKI, T. et al. Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. **Mycoscience**, v.46, n.3, p.162-183, 2005.

- ARRUDA, G. M. T. et al. Morphological and molecular characterization of the sudden death syndrome pathogen of soybean in Brazil. **Plant Pathology**, v.54 ,n.1, p.53-65, 2005.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS. **Anuário Abrasem 2003**. Brasília, 2003. 164p.
- BALARDIN, R. S.; RUBIN, S. A. L. Reação de germoplasma de soja à *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1999, Londrina. **Anais...**Londrina: Embrapa Soja, 1999. p.461.
- BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais/Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos. Dados históricos – agrometeorológicos. Consulta específica ao banco de dados por mês/ano com filtro em alguns sensores. Disponível em: <http://popoca.cptec.inpe.br:8080/BDPCD/consulta_pcda.jsp>. Acesso em: 20 jan. 2007.
- BROWDER, L. E. A modified detachhead-leaf culture technique for study of cereal rust. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 48, p. 906-908, 1964.
- CENTURION, M. A. P. C. et al. Correlação entre níveis de infecção do oídio da soja em diferentes condições. **Brazilian Phytopathology**, Brasília, v. 26, supl., p. 395, 2001.
- CENTURION, M. A. P. C. et al. Mecanismos de atuação antagonistas selecionados para o controle biológico da ferrugem do feijoeiro (*Uromyces phaseoli* (Reben.) Wint.) **Científica**, São Paulo, v.22, p.163-175, 1994.
- CENTURION, M. A. P. C. et al. Reação de genótipos de soja ao oídio (*Microsphaera diffusa*) em folhas destacadas e em condições de casa de vegetação e de campo. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.6, n.1, p.109, 2000.
- CENTURION, M. A. P. C.; KIMATI, H. Seleção e identificação de microorganismos antagonistas a ferrugem do feijoeiro (*Uromyces phaseoli*). **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.20, n.3/4, p.174-178, 1994.
- COSTA, C. L.; YORINORI, J. T. Métodos de inoculação de *Fusarium solani* para avaliação de resistência em soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, p.332, 1995a. Suplemento.

- COSTA, C. L.; YORINORI, J. T. Reação de cultivares de soja à podridão vermelha da raiz (PVR) (*Fusarium solani*), avaliada pelo método do palito. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, p.332, 1995b. Suplemento.
- COSTA, C. L.; YORINORI, J. T. Variabilidade morfológica e patologia de isolados de *Fusarium solani* associados à podridão vermelha da raiz em soja. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 18., 1996, Uberlândia. **Ata e resumos**. Uberlândia: UFU, 1997. p.321-322.
- DOENÇAS da Soja. **Boletim Técnico de Soja**, Rondonópolis, n.8, p.88-111, 2004.
- EATHINGTON, S. R. et al. Disease pressure in Illinois. **Plant Disease**, St. Paul, v.77, p.11136-11139, 1993.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Recomendações técnicas para a cultura da soja na região Central do Brasil 1996/97**. Londrina: Embrapa Soja, 1996. 164p. (Documentos, 96).
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologia de produção de soja na região Central do Brasil 2001/02**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 267p.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologia de produção de soja - região Central do Brasil 2004**. Londrina: Embrapa Soja, 2003. 237p. (Sistema de Produção, 4).
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologia de produção de soja - região Central do Brasil 2007**. Londrina: Embrapa Soja, 2006. 225p. (Sistemas de Produção, 11).
- FARIAS NETO, A. L. et al. Avaliação de genótipos de soja quanto a resistência à podridão vermelha da raiz (*Fusarium solani* f. sp. *glycines*) (compact disc). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1., 2001, Goiânia. **Anais...**Goiânia: UFG/Embrapa Arroz e Feijão/ AGENCIARURAL, 2001.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, J. A. **Stages of soybean development**. Ames: Yowa State University, Cooperative Extension Service, 1977. 11p. (Special Report, 80).
- FRANCO, H. B. J. ***Fusarium solani* f. sp. *glycines*: crescimento , esporulação e viabilidade do emprego da técnica da folha destacada para estudos de reações em genótipos de soja**. 2004. 105f. Monografia (Trabalho de graduação em

Agronomia). – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

FRONZA, V. **Genética da reação da soja à *Fusarium solani* f. sp. *glycines***. 2003. 154f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

GÁSPERI, A. C. **Variabilidade de isolados, reação de cultivares e danos causados por *Fusarium solani* f. sp. *glycines* em soja**. 2000. 91f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2000.

GÁSPERI, A. C.; PRESTES, A. M.; COSTAMILAN, L. M. Reação de cultivares de soja à podridão vermelha da raiz causada por *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p.544-547, 2003.

GRAY, L. E.; ACHENBACH, L. A. Severity of foliar symptoms and root crown rot of soybean inoculated with various isolates and inoculum rates of *Fusarium solani*. **Plant Disease**, St. Paul, v.80, p.1197-1199, 1996.

HARTMAN, G. L.; HUANG, Y. H.; NELSON, R. L.; NOEL, G. R. Germplasm evaluation of *Glycine max* for resistance to *Fusarium solani*, the casual organism of sudden death syndrome. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, p.515-518, 1997.

HEAVENER, D. L.; NICKELL, C. D.; KOLB, F. L. Genetic analysis of the response of the soybean cultivar Asgrow A4715 to *Fusarium solani*. **Soybean Genetics Newsletter**, Ames, v.23, p.144-148, 1996.

HENESSY, C. M. R.; SACKSTON, W. E. Studies on sunflower rust. V. Culture of *Puccinia helianthi* throughout its complete life cycle on detached leaves on sunflower (*Helianthus annuus*). **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.48, p.1811-1813, 1970.

HERSHMAN, D. E.; HENDRIX, J. W.; STUCKEY, R. E.; BACHI, P. R.; HENSON, G. Influence of planting date and cultivar on soybean sudden death syndrome in Kentucky. **Plant Disease**, St. Paul, v.74, p.761-766, 1990.

HIRREL, M. C. Sudden death syndrome of soybean: A disease of unknown etiology. **Phytopathology**, St. Paul, v.73, p.501-502, 1983.

- HOOKE, A. L.; YARWOOD, C. E.. Culture of *Puccinia sorghi* on detached leaves of corn and *Oxalis corniculata*. **Phytopathology**, St. Paul, v.56, p.536-539, 1966.
- HUANG, Y. H.; HARTMAN, G. L. Reaction of selected soybean genotypes to isolates of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* and their culture filtrates. **Plant Disease**, St. Paul, v.82, p.999-1002, 1998.
- JARDINE, D. J.; RUPE, J. C. First report of sudden death syndrome of soybeans caused by *Fusarium solani* in Kansas. **Plant Disease**, St. Paul, v.77, p.1264, 1993.
- KILLEBREW, F. et al. Greenhouse and field evaluation of *Fusarium solani* pathogenicity to soybean seedlings. **Plant Disease**, St. Paul, v. 72, p. 1067-1070, 1988.
- KIMATI, H. et al. (Edi). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 1, 1997.
- KLINGELFUSS, L.H. et al. Resposta de genótipos de soja à síndrome da morte súbita (compact disc). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1., 2001, Goiânia. **Anais...**Goiânia: UFG/Embrapa Arroz e Feijão/AGENCIA RURAL, 2001a.
- KLINGELFUSS, L.H. et al. Resposta de genótipos de soja à síndrome da morte súbita. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 23., 2001, Londrina. **Resumos...** Londrina: Embrapa Soja, 2001b. p.113-114.
- KLINGELFUSS, L. H., YORINORI, J.T., ARIAS, C. A. A.;DESTRO, D. Reaction of soybean cultivars to sudden death syndrome and disease scoring methods for screening resistance. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.2, p.257-264, 2002.
- KLINGELFUSS; L. H.; YORINORI, J. T.; DESTRO, D. Métodos de inoculação para quantificação de resistência em soja a *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, em casa de vegetação. **Fitopatologia. Brasileira**. Brasília, v.32, n.1, p.50-55, 2007.
- LEÃO, R. Z. R.; FREITAS, M. A.; CAFÉ FILHO, A. C. Reação de cultivares de soja à inoculação com isolados de diferentes espécies e *formae speciales* de *Fusarium*. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.24, n.3/4, p.414-421, 1998.
- LI, S.; HARTMAN, G. L.; GRAY, L. E.; Chlamydospore formation, production, and nuclear status in *Fusarium solani* f. sp. *glycines* soybean sudden death syndrome-causing isolates. **Mycologia**, Bronx, v.90, n.3, p.414-421, 1998.

- LIM, S. M. A Technique for inoculating soybeans in the greenhouse with *Fusarium solani*. **Phytopathology**, St. Paul, v.81, p.1238, 1991.
- LUMBROSO, E. et al. Completion life cycles on *Puccinia hodei* and *Uromyces siliarum* on detached leaves on their host. **Phytopathology**, St. Paul, v.67, p.941-944, 1977.
- MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres. 1980. 251p.
- McLEAN, K.; LAWRENCE, G. W. Interrelationship of *Heterodera glycines* and *Fusarium solani* in sudden death syndrome of soybean. **Journal of Nematology**, v.25, n.3, p.434-439, 1993.
- MELGAR, J.; ROY, K. W.; ABNEY, T. S. Sudden death syndrome of soybean: Etiology, symptomatology, and effects of irrigation and *Heterodera glycines* on incidence and severity under field conditions. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.72, p.1647-1653, 1994.
- MELGAR, J.; ROY, K. W. Soybean sudden death syndrome: cultivar reactions to inoculation in a controlled environment and host range and virulence of casual agent. **Plant Disease**, St. Paul, v.78, p.265-268, 1994.
- MEYERS, J. A.; COOK, R. J. Induction of chlamydospore formation in *Fusarium solani* by abrupt removal of the organic carbon substrate. **Phytopathology**, St. Paul, v. 62, p. 1148-1153, 1972.
- MIGNUCCI, J. S. Development of soybean leaf cultures for maintenance and study of *Microsphaera diffusa*. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v.62, p.271-273, 1978.
- MORAES, S. A.; SAVY FILHO, A. Reação de seis cultivares de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) a *Puccinia arachidis* Speg. **Summa Phytopatologia**, Jaboticabal, v. 9, p.140-53, 1983.
- NAKAJIMA, T. et al. Occurrence of soybean sudden death syndrome caused by *Fusarium solani* in Brazil. In: INTERNATIONAL *Fusarium* WORKSHOP, 7., 1993, Pennsylvania. **Abstracts**...Pennsylvania: Pennsylvania State University, 1993. p.79.
- NELSON, B. D. et al. Reaction of soybean cultivars to isolates of *Fusarium solani* from the Red River Valley. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, p.664-668, 1997.

- NJITI, V. N. Relationship between soybean sudden death syndrome disease measures and yield components in F₆- derived lines. **Crop Science**, Madison, v.38, p.673-678, 1998.
- NJITI, V. N.; SHENAUT, M. A.; SUTTNER, R. J.; SCHIMIDT, M. E.; GIBSON, P. T. Soybean response to sudden death syndrome: inheritance influenced by cyst nematode resistance in Pyramid x Douglas progenies. **Crop Science**, Madison, v.36, p.1165-1170, 1996.
- NJITI, V. N.; SUTTNER, R. J.; GRAY, L. E.; GIBSON, P. T.; LIGHTFOOT, D. A. Rate-reducing resistance to *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* underlies field resistance to soybean sudden death syndrome. **Crop Science**, Madison, v.37, p.132-138, 1997a.
- NJITI, V. N.; TORTO, G. A.; GRAY, L. E.; LIGHTFOOT, D. A. An effective greenhouse assay for field resistance to SDS. **Soybean Genetics Newsletter**, Ames, v.24, p.132-135, 1997b.
- O'DONNELL, K. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, Bronx, v. 92, p.919-938, 2000.
- PARK, D. Effect of substrate on a microbial antagonism, with reference to soil conditions. **British Mycological Society Transaction**, London, v. 39, p. 239-259, 1956.
- RINGLER, G. A.; NICKELL, C. D. Genetic resistance to *Fusarium solani* in Pioneer Brand 9451 soybean. **Soybean Genetics Newsletter**, Ames, v.23, p.149-154, 1996.
- ROY, K. W. et al. Sudden death syndrome of soybean. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, n.10, p.1100-1111, 1997.
- ROY, K. W. *Fusarium solani* on soybean roots: Nomenclature of the casual agent of sudden death syndrome and identity and relevance of *F. solani* form B. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, p. 259-266, 1997a.
- ROY, K. W. Sporulation of *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, the causal agent of sudden death syndrome, on soybean plants symptomatic for the disease in midwestern and southern United States. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, p.566-569, 1997b.
- ROY, K. W., et al. Diagnosis of sudden death syndrome of soybean. **Plant Diagn. Quart.**, v.12, p.166-168, 1991.

- ROY, K. W.; LAWRENCE, G. W.; HODGES, H. H.; MCLEAN, K. S.; KILLEBREW, J. F. Sudden death syndrome of soybean: *Fusarium solani* as incitant and relation of *Heterodera glycines* to disease severity. **Phytopathology**, St. Paul, v.79, p.191-197, 1989.
- RUPE, J. C.; GBUR, E. E. Effect of plant age, maturity group, and the environment on disease progress of sudden death syndrome of soybean. **Plant Disease**, St. Paul, v.77, p.139-143, 1995
- RUPE, J. C. Epidemiology of sudden death syndrome of soybean. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1999, Londrina. **Anais...** Londrina:Embrapa Soja, 1999. p.139-148.
- RUPE, J. C. et al. Cultivar responses to sudden death syndrome of soybean. **Plant Disease**, St. Paul, v.75, p.47-50, 1991.
- RUPE, J. C. et al. Differentiation of the sudden death syndrome pathogen of soybean, *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, from other isolates of *F. solani* based on cultural morphology, pathogenicity, and mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 79, p. 829-835, 2001.
- RUPE, J. C. Frequency and pathogenicity of *Fusarium solani* recovered from soybeans with sudden death syndrome. **Plant Disease**, St. Paul, v.73, p.581-584, 1989.
- RUPE, J. C.; HIRRELL, M. C.; HERSHMAN, D. E. Sudden death syndrome. In: SINCLAIR, J. B.; BACKMAN, P. A. (Ed.). **Compendium of Soybean**. 3rd. ed. St Paul: APS Press, 1989. p. 84-85.
- SCANDIANI, M. M. et al. Síndrome de la muerte repentina de la soja en el norte de la provincial de Buenos Aires y sur de Santa Fé. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 2., 2002, Foz do Iguaçu. **Resumos...** Londrina: Embrapa Soja, 2002. p.76.
- SCHERM, H.; YANG, X. B. Development of sudden death syndrome of soybean in relation to soil temperature and soil water matric potencial. **Phytopathology**, Saint Paul, v.86, p.642-649, 1996.
- SNYDER, W. C.; HANSEN, H. N. The species concept in *Fusarium*. **American Journal of Botany**, Columbus, v.27, p. 64-67, 1940.

- STEPHENS, P. A. et al. Genetic analysis of resistance to *Fusarium solani* in soybean. **Crop Science**, Madison, v.33, p.929-930, 1993a.
- STEPHENS, P. A. et al. Relationship between field and greenhouse reactions of soybean to *Fusarium solani*. **Plant Disease**, St. Paul, v.77, p.163-166, 1993b.
- STEPHENS, P. A. et al. Sudden death syndrome of soybean development in soybean cultivars differing in resistance to *Fusarium solani*. **Crop Science**, Madison, v.33, p.63-66, 1993c.
- TAYLOR, J. W. et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in Fungi. **Fungal Genetics Biology**, Orlando, v.31, p. 21-31, 2000.
- TORTO, G. A.; NJITI, V.; LIGHTFOOT, D. A. Loci underlying resistance to sudden death syndrome and *Fusarium solani* in field and greenhouse assays do not correspond. **Soybean Genetics Newsletter**, Ames, v.23, p.163-166, 1996.
- TUITE, J. **Plant phathological methods**. Mineapolis: Burgess, 1969. 239p.
- VENTURA, J. A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados. I - História, meios e procedimento de cultivo. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v.7, p.271-298, 1999.
- WARD, C. H. The detached-leaf technique for testing alfalfa clones for resistance to blach stem. **Phytophathology**, St. Paul, v.49, p. 690-696, 1959.
- WILCOXSON, R. D.; ATIF, A. H.; KOWMAND, B. Slow rusting of weath in the field correlated with stem rust severity on detached leaves in the greenhouse. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v.58, p.1085-1087, 1974.
- WRATHER, J. A. et al. Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1994. **Plant Disease**, St Paul, v.81, p.107-110, 1997.
- YANG, X. B.; RIZVI, S. S. First report of sudden death syndrome of soybean in Iowa. **Plant Disease**, St. Paul, v.78, n.8, p.830, 1994.
- YARWOOD, C. E. Detached leaf culture. **Botanical Review**, Bronx, v.12, p.1-56, 1946.
- YORINORI, J. T. **Cancro da haste da soja**: epidemiologia e controle. Londrina: Embrapa Soja, 1996. 75p. (Circular Técnica, 14).
- YORINORI, J. T. **Oídio da Soja**. Londrina: Embrapa Soja. Oídiosoja, 1997a. 13p.

YORINORI, J. T. Evolução da ocorrência e da severidade da podridão vermelha da raiz da soja (PVR/SDS) e reação das cultivares comerciais à doença In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 22., 2000, Cuiabá.

Resumos ...Londrina: Embrapa Soja, 2000a, p.94.

YORINORI, J. T. Riscos de surgimento de novas doenças na cultura da soja. In: TECNOLOGIA E COMPETITIVIDADE DA SOJA NO MERCADO GLOBAL, 28., 2000, Cuiabá. **Anais** ... Cuiabá: Fundação MT, 2000b. p.165-169.

YORINORI, J. T. Situação atual das doenças potenciais no Cone Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 2., 2002, Foz do Iguaçu. **Anais**... Londrina: Embrapa Soja, 2002. p.171-186.

YORINORI, J. T. Soja (*Glycine max* (L.) Merrill): controle de doenças. In: RIBEIRO DO VALE, F. X.; ZAMBOLIM, L. (Edi.) **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa, MG: Ministério da Agricultura e Abastecimento, 1997b. v.2, p.953-1023.

YORINORI, J. T.; CHARCHAR, M. J. D.; NASSER, L. C. B.; HENNING, E. A. Doenças da soja e seu controle In: ARANTES, N. E.; SOUZA, P. I. M. **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: POTAFOS, 1993. p.333-390.

YORINORI, J. T.; HIROMOTO, D. M. Controle integrado de doenças da soja: determinação de perdas de vigor em soja causadas por doenças fúngicas. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Resultados de pesquisa da Embrapa Soja 1997**. Londrina: Embrapa Soja, 1998. p.112-114.

YORINORI, J. T.; NOMURA, S. L. Cultivares de soja resistentes à podridão vermelha da raiz causada por *Fusarium solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, p.339, 1994. Suplemento.