

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**PRODUÇÃO DE ESPOROS E INOCULAÇÃO DE**  
***Corynespora cassicola* EM SOJA**

**MÁRCIA MULITERNO DE MELO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração Fitopatologia.

Passo Fundo, fevereiro de 2009

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**PRODUÇÃO DE ESPOROS E INOCULAÇÃO DE**  
***Corynespora cassicola* EM SOJA**

**MÁRCIA MULITERNO DE MELO**  
**Engenheira-Agrônoma**

**Orientador: Prof. Ph.D. Erlei Melo Reis**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Fitopatologia.

Passo Fundo, fevereiro de 2009.

## **AGRADECIMENTOS**

*À Universidade de Passo Fundo, em especial ao Programa de Pós-graduação em Agronomia pela oportunidade de realizar o curso;*

*A Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária pelo suporte de laboratórios, da área experimental e de equipamentos;*

*À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;*

*Ao professor Ph.D Erlei Melo Reis, por ter me recebido tão bem, pelo apoio, incentivo e pela primorosa orientação prestada;*

*À todos os professores do PPGAgro, pelos ensinamentos e amizade.*

*Ao meu marido Cristian Berton pelo carinho e toda paciência durante esses dois anos;*

*A minha família e a família Berton por todo incentivo, força e por fazerem parte do meu crescimento pessoal e profissional;*

*As minhas queridas amigas, Joana Liska Bock, e Daniele Farias, pelas horas de descontração, pelo carinho e amizade incondicional;*

*À todos os colegas e amigos do laboratório, em especial, a Rita de Cássia Carlini pelo companheirismo e por tornar essa caminhada mais alegre.*

*Ao colega e amigo Tiago Zanatta pelo auxílio nas análises estatísticas.*

*Aos funcionários do Laboratório de Micologia da UPF, Cinara, Elaine e Paulo, pela colaboração e paciência;*

*A todos os estagiários do Laboratório de Fitopatologia da UPF que de uma forma ou de outra contribuíram para execução dos experimentos;*

*À secretária Mari, pela atenção com todos;*

*Aos participantes da banca examinadora;*

*À Deus, pela saúde, perseverança, paciência e coragem;*

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
Ocorrência.....	14
Etiologia.....	15
Sintomatologia.....	17
Ciclo da doença.....	18
Controle.....	20
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>PATOGENICIDADE DE UM ISOLADO DE</b>	
<b><i>Corynespora cassiicola</i>.....</b>	<b>24</b>
Resumo .....	24
Abstract.....	25
Introdução.....	26
Material e métodos.....	27
Resultados e discussão.....	32
Conclusão.....	34
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>EFEITO DE SUBSTRATOS, LUZ E PAPEL DE</b>	
<b>FILTRO NA ESPORULAÇÃO DE <i>Corynespora</i></b>	
<b><i>cassiicola</i> .....</b>	<b>35</b>
Resumo .....	35
Abstract.....	36
Introdução.....	37
Material e métodos.....	38
Resultados e discussão.....	41
Conclusão.....	44

<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>LIMIARES TÉRMICOS E TEMPERATURA ÓTIMA PARA A GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE <i>Corynespora cassicola</i> EM MEIO DE CULTURA.....</b>	<b>45</b>
Resumo .....	45
Abstract.....	46
Introdução.....	47
Material e métodos.....	48
Resultados e discussão.....	49
Conclusão.....	51
<b>CAPÍTULO IV</b>	
<b>REAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA A <i>Corynespora cassicola</i>.....</b>	<b>52</b>
Resumo .....	52
Abstract.....	53
Introdução.....	54
Material e métodos.....	55
Resultados e discussão.....	58
Conclusão.....	60
<b>CAPÍTULO V</b>	
<b>EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE INÓCULO DE <i>Corynespora cassicola</i> NA INTENSIDADE DA MANCHA- ALVO EM SOJA.....</b>	<b>62</b>
Resumo .....	62
Abstract.....	63
Introdução.....	64
Material e métodos.....	65
Resultados e discussão.....	68
Conclusão.....	71
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>72</b>

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela</b>	<b>Página</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	
1 Influência de substratos sobre a esporulação de <i>Corynespora cassicola</i> (nº conídios.cm <sup>2</sup> ), na presença e ausência da luz, e, com e sem sobreposição de papel filtro.....	42
<b>CAPÍTULO IV</b>	
1 Reação de cultivares de soja à <i>Corynespora cassicola</i> em casa-de-vegetação.....	59

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
<b>CAPÍTULO III</b>	
1 Relação da germinação de conídios de <i>Corynespora cassiicola</i> em função da temperaturas em três tempos de exposição.....	50
<b>CAPÍTULO V</b>	
1 Efeito da concentração de inóculo de <i>Corynespora cassiicola</i> sobre o número e diâmetro de lesões em folíolos de soja.....	70

**PRODUÇÃO DE ESPOROS E INOCULAÇÃO DE *Corynespora cassiicola* EM SOJA**

**Márcia Muliterno de Melo<sup>1</sup> & Erlei Melo Reis<sup>2</sup>**

**RESUMO** - A mancha-alvo é encontrada na maioria das áreas produtoras de soja do Brasil. O nome da doença se deve aos anéis concêntricos, mais escuros no centro e halos amarelos presentes nas manchas, que lembram o formato de um alvo. Desfolha prematura pode ocorrer em cultivares suscetíveis, assim como o apodrecimento das vagens e numerosas manchas nas hastes. Justifica-se o trabalho considerando a ocorrência frequente da doença em lavouras da região centro oeste do país, assim como a falta de estudos relacionados a cultivares resistentes. Os objetivos desse estudo foram: caracterizar morfológicamente o agente causal de um isolado da mancha alvo da soja, quantificar a esporulação de *Corynespora cassiicola* em diferentes substratos; avaliar o efeito da temperatura na germinação de conídios; avaliar a reação de cultivares de soja ao patógeno e, quantificar o efeito de diferentes concentrações de inóculo sobre a intensidade da doença. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia, em

---

<sup>1</sup> Engenheira Agrônoma, mestranda do programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração em Fitopatologia. marciamuliterno@gmail.com

<sup>2</sup> Orientador, Engenheiro Agrônomo, Ph.D., professor da FAMV/ PPGAgro/UPF. erleireis@tpo.com.br

casa-de-vegetação e câmaras climatizadas da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo – RS. Comparando os sintomas da doença com as descrições da literatura e com o reisolamento do patógeno, seguido de sua caracterização morfológica, confirmou-se à identificação e patogenicidade de *C. cassiicola* isolada de folhas de soja. Avaliando a esporulação de *C. cassiicola* em diferentes substratos (Batata Dextrose Ágar, Solução Czapek Ágar, Alimento infantil, Malte Ágar, Farinha de aveia e suco V8 Ágar), a Solução Czapek Ágar na presença de luz fotoperíodo 12 horas, acrescido de papel filtro apresentou maior esporulação de *C. cassiicola*. Entre as temperaturas testadas (6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40 e 41°C) para avaliar a germinação de conídios de *C. cassiicola*, temperatura ótima para foi de 23°C, o limiar térmico inferior foi de 7°C e o superior de 39°C. O cultivar mais suscetível entre os cultivares testados (BMX Apolo, BMX Potência, BRS 243 RR, BRS 255 RR, CD 214 RR, CD 219 RR, Fundacep 56 RR, Fundacep 59 RR, Pioneer P98C11, Pioneer P98R31) ao número de lesão por folíolo foi BRX Potência, e ao diâmetro de lesão, BRX Apolo. Fundacep 56 e 59 foram os cultivares mais resistentes ao patógeno, tanto para número quanto para diâmetro de lesão. Demonstrou-se que a concentração de  $35 \times 10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup> causa uma intensidade da doença que pode ser usada na avaliação da reação de cultivares de soja .

**Palavras-chave:** *Glycine max*, mancha-alvo, reação de cultivares.

**PRODUCTION OF SPORES AND INOCULATION OF *Corynespora cassicola* IN SOYBEAN**

**Márcia Muliterno de Melo<sup>1</sup> & Erlei Melo Reis<sup>2</sup>**

**ABSTRACT-** The target spot is found in most soybean producing areas of Brazil. The name of the disease is due to the concentric rings, with center and darker yellow halos present in the patches, which resemble the shape of a target. Premature defoliation may occur in susceptible cultivars, and the decay of many spots on pods and stems. The objectives of this study were to morphologically characterize the causal agent of an isolated target spot of soybean, quantify the sporulation of *Corynespora cassicola* on different substrates; evaluate the effect of temperature on germination of conidia; assess the reaction of soybean cultivars to the pathogen and to quantify the effect of different concentrations of inoculum on the intensity of the disease. The experiments were conducted at the Laboratory of Plant, home-de-vegetation and climate chambers of the School of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Passo Fundo - RS. Comparing the symptoms of the disease with the descriptions in literature and the reisolations of the pathogen, followed by their

---

<sup>1</sup> Engenheira Agrônoma, mestranda do programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração em Fitopatologia. marciamuliterno@gmail.com

<sup>2</sup> Orientador, Engenheiro Agrônomo, Ph.D., professor da FAMV/ PPGAgro/UPF. erleireis@tpo.com.br

morphological characterization, it is confirmed the identification and pathogenicity of *C. cassiicola* isolated from leaves of soybean. Assessing the sporulation of *C. cassiicola* on different substrates (Potato Dextrose Agar, Czapek Solution Agar, infant food, Malt Agar, Oat Meal Agar and V8 juice), Czapek solution agar in the presence of light photoperiod 12 hours, plus filter paper showed greater sporulation of *C. cassiicola*. Among the tested temperatures (6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40 and 41 ° C) to assess the germination of conidia of *C. cassiicola*, temperatures to 23 ° C was the lower thermal threshold was 7 ° C and higher than 39 ° C. The cultivar most susceptible among the tested cultivars (Apollo BMX, BMX Power, BRS 243 RR, BRS 255 RR, RR 214 CD, RR 219 CD, Fundacep 56 RR, 59 RR Fundacep, P98C11 Pioneer, Pioneer P98R31) the number of injuries by leaflet was BRX Power, and the diameter of lesion, BRX Apollo. Fundacep 56 and 59 were the most resistant cultivars to the pathogen, both in number and to diameter of lesion. It was demonstrated that the concentration of  $35 \times 10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup> causes a level of disease that can be used in assessing the reaction of soybean cultivars.

**Keywords:** *Glycine max*, target spot, cultivar reaction.

## 1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma planta herbácea pertencente à família das Fabaceas. Geralmente é anual e suas variedades podem ser classificadas, quanto à duração do ciclo vegetativo, em: precoces, semiprecoces e tardias. Esta planta é originária do sudoeste asiático, e há relatos de seu cultivo há mais de 6 ou 7 mil anos na China. Nos dias atuais, a soja, é uma das mais importantes leguminosas cultivadas no mundo (GOMES, 1990; AZEVEDO, 1993; BORÉM, 1999).

O primeiro registro de cultivo de soja no Brasil, data de 1914 no município de Santa Rosa, RS. Entretanto, a expansão da soja no Brasil aconteceu nos anos 70, com o interesse da indústria de óleo e a demanda do mercado internacional.

Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, sendo superado apenas pelos Estados Unidos. A produção brasileira de soja somou, na safra 2007/2008, 60 milhões de toneladas, superando em 2,8 % a do ano anterior. A área colhida foi de 21 mil ha. Na média nacional, o rendimento da soja foi de 2,8 kg.ha<sup>-1</sup>, 18,3% maior que os 2,3 kg.ha<sup>-1</sup> registrados em 2006/2007, em razão das condições climáticas mais favoráveis e da priorização do plantio pelos produtores nas áreas mais aptas ao cultivo. Os principais estados produtores no Brasil são Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul (CONAB, 2009).

Devido a sua grande adaptabilidade a diferentes latitudes, solos e condições climáticas, a soja é uma das plantas mais fáceis de serem

cultivadas, porém, seu potencial de produtividade dificilmente é alcançado por não serem tomados alguns cuidados essenciais. Entre os principais fatores que limitam a obtenção de altas produtividades estão as doenças, sendo algumas delas, uma vez introduzidas numa região, tornam-se de difícil controle. Cerca de 47 doenças que ocorrem em soja no Brasil, causam um prejuízo anual de ordem de 1 bilhão de dólares na produção de soja (YORINORI, 1997).

Embora não tenham sido determinados os danos, entre as doenças que afetam a soja, merece destaque a mancha-alvo, causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. Esta doença tem ocorrido em caráter epidêmico em vários estados sobre tudo no Centro-Oeste brasileiro.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Ocorrência**

O primeiro relato do patógeno na cultura da soja foi nos Estados Unidos, em 1945, por OLIVE et al (1945).

No Brasil, de acordo com Almeida et al. (1976), foi relatada pela primeira vez por YORINORI no estado do Paraná, e por ALMEIDA no estado de São Paulo. No entanto não descreveram a realização da prova de patogenicidade.

Na safra 1987/88, a mancha-alvo foi constatada nos Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul (YORINORI, 1989).

Em 1995/96, a doença foi observada em diversas propriedades nos municípios de Cascavel, Castro, Ponta Grossa e Pitanga-Paraná, causando desfolha em diferentes níveis, e redução de rendimento em todas os cultivares em cultivo (YORINORI, 1996)

A mancha-alvo é encontrada em muitas áreas produtoras de soja do Brasil. É uma doença de grande importância na região do cerrado, onde ocorre com maior frequência.

A mancha-alvo ocorre no final do ciclo da soja, causando prejuízos econômicos. No entanto, se trata de uma doença potencialmente destrutiva em cultivares suscetíveis em épocas de elevada precipitação pluvial (PHILLIPS, 1989).

### **2.3 Etiologia**

O fungo causador do sintoma de mancha-alvo é denominado de *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt.) Wei 1950. Porém, inicialmente foi classificado como *Cercospora melonis* Cooke, *C. vignicola* Kawamura, *Helminthosporium vignae* Olive, e *H. vignicola* (Kawamura) Olive) (SNOW & BERGGREN, 1989).

Esse fungo pertence à classe dos Deuteromicetos, subclasse Hyphomycetidae, família Dematiaceae, gênero *Corynespora* e espécie *cassicola* (BARNET & HUNTER, 1972).

O patógeno produz conidióforos eretos, ramificados, com até 20 septos, de coloração marrom, medindo 4 - 11 x 44 - 135 $\mu$ m (SNOW & BERGGREN, 1989; ELLIS, 1971). Os conídios emergidos apresentam-se isolados ou em cadeia de dois a seis, cor parda, dilatados na base, retos ou ligeiramente curvos, com 3 a 20 septos, medindo 7 - 22 x 39 - 520 $\mu$ m, média 8 x 135 $\mu$ m. São de hialinos a marrom, retos ou ligeiramente curvados para o ápice, subcilíndricos, ligeiramente cônicos para o ápice, truncados no hilo basal. (SNOW & BERGGREN, 1989; ELLIS, 1971).

O fungo esporula sobre uma vasta gama de temperatura em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) ou Czapek Ágar, produzindo tubos germinativos em uma ou em ambas extremidades. Clamidósporos formados em culturas mais velhas são hialinos, terminais ou intercalares, e ovais, medindo 14 – 20 x 16 – 30 $\mu$ m (SEAMAN et al., 1965).

Segundo Olive et al., (1945) o fungo desenvolve-se e esporula em meio de BDA, farinha de milho-ágar, ameixa-ágar, malte-ágar e Czapek-ágar, sendo que a maior produção de conídios ocorre em BDA e Czapek-ágar. ALMEIDA et al., (1976) também observaram o crescimento e esporulação do fungo em diferentes meios de cultura, e concluiu que nos meios V-8 e alimento infantil o fungo obteve melhor esporulação.

De acordo com Onesiran et al. (1975), a presença da luz estimula a esporulação, embora a quantidade de esporulação não tenha sido

uniforme entre os isolados. Almeida & Yamashita (1976) também observaram que a presença de luz contínua favoreceu o crescimento e esporulação, quando em comparação com ambiente na ausência de luz.

A temperatura para o desenvolvimento do patógeno varia de 18 a 21°C (min 7°C, máx 39°C). O micélio em meio de cultura é branco e floculento, tornando-se mais tarde cinza escuro e constituindo de um emaranhado preto oliváceo (SNOW & BERGGREN, 1989; ELLIS, 1971, SEAMAN et al., 1965). No entanto, Almeida et al. (1994) em trabalho sobre diferenciação de isolados de *C. cassiicola* demonstraram que o fungo se desenvolve vagarosamente em meio de cultura BDA, formando um micélio de tonalidade escura e de coloração cinza-esverdeada.

Conforme Snow & Berggren, (1989) existem no mínimo duas raças de *C. cassiicola*. O fungo que infecta o hipocótilo, raízes e haste de soja (causador da podridão radicular) é patogênica e morfológicamente diferente do que infecta folhas, vagens e sementes (causadores da mancha-alvo), sendo esse, de outra raça.

Spencer & Walters (1969) em um trabalho sobre variação de isolados de *C. cassiicola* comprovaram a existência de duas raças desse fungo por comparação de isolados de feijão caupi e de soja.

## **2.4 Sintomatologia**

Os sintomas em folhas surgem como pequenos pontos com um halo amarelo, que crescem até dois cm de diâmetro e tornam-se

circulares, de coloração parda. O nome da doença se deve a anéis concêntricos, mais escuros no centro e halos amarelos presentes nas manchas, que lembram o formato de um alvo. Desfolha prematura pode ocorrer em cultivares suscetíveis, assim como o apodrecimento das vagens lesões em hastes. O fungo pode atingir também as sementes. (ALMEIDA et al, 2005; SNOW & BERGGREN, 1989).

Também infecta os pecíolos e haste, que tornam-se marrom escuro, e, nos entrenós causa pequenos pontos alongados, formando lesões. Manchas nas vagens são geralmente circulares e de 1 mm de diâmetro, levemente deprimidas, roxo escuro e com margens marrom. Durante períodos de chuvas ou de umidade prolongada, as manchas coalescem e cobrem totalmente a vagem. Em alguns casos, o fungo penetra na vagem e produz pequenas lesões, marrom escura na semente (SNOW & BERGGREN, 1989).

## **2.5 Ciclo da doença**

### **2.5.1 Fontes de inóculo e sobrevivência**

Por ser um patógeno necrotrófico, o fungo sobrevive em restos culturais, plantas voluntárias, na semente de soja e em hospedeiros alternativos.

O fungo *C. cassicola* pode sobreviver em hastes, raízes, sementes, assim como nos restos culturais de soja, na forma de

clamidosporos. Além disso, o patógeno pode colonizar restos culturais de um grande número de espécies vegetais (SNOW & BERGGREN, 1989).

Trata-se de uma espécie cosmopolita, frequentemente abundante nos trópicos, causando manchas foliares sobre diversas plantas hospedeiras, incluindo espécies de importância econômica, tais como: algodão (*Gossypium hirsutum* L.), beringela (*Solanum melongena* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), fumo (*Nicotiana tabacum* L.), mamona (*Ricinus communis* L.), mandioca (*Manihot* sp.), melância (*Citrullus vulgaris* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), seringueira (*Hevea brasiliensis* (HBK) Muell. Arg., tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller), além da soja (SINCLAIR 1999). No Brasil, *C. cassiicola* já foi relatado em diversas plantas cultivadas, destacando-se essências florestais (FERREIRA & ALFENAS, 1980), cacauzeiro (DUARTE et al., 1978) e seringueira (GASPAROTTO et al., 1988).

### 2.5.2 Disseminação

Conforme Almeida et al. (2005), *C. cassiicola* é disseminada pelo vento e gotas de chuva.

A disseminação de *C. cassiicola* ocorre principalmente pelo vento. O prolongado molhamento foliar auxilia a infecção. O vento é o agente responsável pela remoção dos conídios e pelo transporte do inóculo. Para esse grupo, a remoção, o transporte para outras plantas ou lavouras e a

deposição são favorecidos pelo tempo seco. Maude (1996) denomina esses propágulos de esporos secos. Uma vez depositado na superfície da planta e na presença de água livre, o conídio germina, produzindo tubo germinativo e apressório.

### 2.5.3 Infecção

Segundo Agrios (1988), o processo de infecção vai desde a penetração do patógeno no hospedeiro até o aparecimento dos sintomas.

Esporos de patógenos foliares, como *C. cassicola*, após serem depositados na superfície do hospedeiro, se fixa e emite o tubo germinativo para iniciar a penetração. Os primeiros sintomas de mancha-alvo em soja, aparecem 5 a 7 dias após a penetração, quando submetidas a temperatura de 20 a 30°C e umidade relativa do ar acima de 80%.

## 2.6 Controle

Os danos provocados por doenças estão entre as principais causas de perdas na agricultura. Novas táticas vêm sendo desenvolvidas e incorporadas ao manejo integrado de doenças de plantas, visando à redução dos custos e de perdas na produção. Fazem parte dessas táticas o desenvolvimento de técnicas sensíveis e rápidas de diagnose, produtos fitossanitários mais eficientes, novas variedades resistentes, utilização do

controle biológico ou alternativo, todas colaborando para um desenvolvimento agrícola econômico e ecologicamente sustentável.

Como controle para mancha-alvo na cultura da soja recomenda-se o uso de cultivares resistentes, o tratamento de sementes, a rotação de culturas e a aplicação de fungicidas (ALMEIDA et al. 2005).

#### 2.6.1 Uso de cultivares resistentes

Roim (2001), em Jaboticabal –SP, testou a reação de 350 cultivares de soja à mancha-alvo. As avaliações dos sintomas de mancha alvo nas folhas de soja inoculadas foram feitas com base na escala de severidade da mancha alvo, considerando os níveis de infecção e a porcentagem de área foliar infectada. Os resultados entre os cultivares avaliados foram de 122 cultivares resistentes, 159 cultivares moderadamente resistentes, 62 cultivares moderadamente suscetíveis e 7 cultivares suscetíveis.

Dados da Embrapa (2003) apontam a reação de 120 cultivares de soja a mancha alvo, baseadas em avaliações a campo e em casa-de-vegetação, com inoculações artificiais. Entre esses cultivares, 12 foram considerados resistentes, 51 moderadamente resistentes, 39 suscetíveis e 18 moderadamente suscetíveis. Esses dados comprovam que ainda é necessário mais pesquisas sobre a reação de cultivares a esse patógeno.

### 2.6.2 Tratamento de sementes

Para o tratamento de sementes de soja, de *Corynespora cassicola*, recomenda-se as misturas de tiabendazole (10% P) 170g + tiram (70%P) 105g/ 100Kg de semente; ou carbendazim (150 g/L) + tiram (350 g/L) SC 200mL/ 100Kg de sementes (REIS et al., 2007).

### 2.6.3 Rotação de culturas

A monocultura ou mesmo o sistema de sucessão trigo-soja ou milho safrinha-soja, tende a provocar a degradação física, química e biológica do solo e a queda da produtividade das culturas. Também proporciona condições mais favoráveis para o desenvolvimento de doenças, pragas e plantas daninhas. Nas regiões dos Cerrados predomina a monocultura de soja entre as culturas anuais (EMBRAPA, 2003). A rotação de culturas é uma medida fundamental para o manejo da mancha-alvo já que esse patógeno é necrotrófico. Almeida, (2005), recomenda rotação de culturas com milho e espécies de gramíneas.

Segundo Costamilan et al. (1999), a manutenção de restos culturais na superfície do solo prolonga a viabilidade dos patógenos necrotróficos e sua permanência na área, pois retarda a decomposição dos resíduos, mantendo, por mais tempo, a fonte nutricional. Em Passo Fundo foram necessários 27 meses para que restos de soja fossem totalmente decompostos. A habilidade de competição saprofítica e as estruturas de

resistência de alguns fungos permitem que esses permaneçam viáveis por muito tempo em uma área.

#### 2.6.4 Quimioterapia

Para o controle químico da mancha-alvo na parte aérea da cultura da soja, são recomendados os seguintes fungicidas: azoxistrobina, azoxistrobina + ciproconazol, carbendazim, difenoconazol, flutriafol, piraclostrobina + epoxiconazol, tebuconazol, tiofanato metílico, tiofanato metílico + flutriafol, trifloxistrobina + ciproconazol, trifloxistrobina + propiconazol (EMBRAPA, 2007).

Em trabalho realizado por Cassetare Neto et al., (2006), com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes fungicidas e doses no controle de ferrugem, antracnose e mancha-alvo em soja, mostrou que a mistura tebuconazol + carbendazim ( $100 + 125 \text{ ml.ha}^{-1}$ ) apresentou melhor controle da mancha-alvo, sendo que nas parcelas tratadas registrou-se a menor desfolha e a maior produtividade da cultura.

## CAPÍTULO I

### PATOGENICIDADE DE UM ISOLADO DE *Corynespora cassiicola*

Márcia Muliterno de Melo<sup>1</sup> & Erlei Melo Reis<sup>2</sup>

**RESUMO** – Em experimentos conduzidos no Laboratório de Fitopatologia - Micologia e em câmara de crescimento da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, procurou-se testar a patogenicidade de um isolado de *Corynespora cassiicola* obtido de folhas de soja. O isolado de *C. cassiicola* usado foi obtido de folhas de soja, oriundas de Primavera do Leste, no ano de 2003, preservados na micoteca do Laboratório de Fitopatologia – Micologia da UPF. Os conídios ao microscópio ótico apresentaram morfologia semelhante a do gênero *Corynespora*. Na mensuração de 200 conídios a partir de isolamento monospórico, obteve-se as seguintes medidas 8-12 x 20 – 280 µm, média de 10 x 150µm. Foram realizados os postulados de Koch para comprovar a patogenicidade. Pela comparação dos sintomas com as descrições da literatura e pelo reisolamento do patógeno, seguido de sua caracterização morfológica, confirma-se à patogenicidade do isolado de *C. cassiicola* usado nesse trabalho.

---

<sup>1</sup> Engenheira Agrônoma, mestranda do programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração em Fitopatologia. marciamuliterno@gmail.com

<sup>2</sup> Orientador, Engenheiro Agrônomo, Ph.D., professor da FAMV/ PPGAgro/UPF. erleireis@tpo.com.br

**Palavras-chave:** mancha-alvo, soja, conídios, esporulação

**PATHOGENICITY OF AN ISOLATE OF *Corynespora cassiicola***

**ABSTRACT** - In experiments conducted at the Laboratory of Plant - Mycology and in the growth chamber of the Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Passo Fundo, tried to test the pathogenicity of an isolate of *Corynespora cassiicola* obtained from leaves of soybean. The isolate of *C. cassiicola* used was obtained from leaves of soybean, spring from the East, in 2003, preserved in the mycology collection of the Laboratory of Plant - Mycology of UPF. The conidia to the optical microscope showed morphology similar to the genus *Corynespora*. In the measurement of 200 conidia from isolation monosporic, returned the following measures 8-12 x 20 - m. Were carried out to confirm Koch's postulates the  $\mu 280 \text{ } \mu\text{m}$ , mean of 10 x 150 pathogenicity. For the comparison of symptoms with the descriptions in literature and the reisolations of the pathogen, followed by their morphological characterization, it is confirmed the pathogenicity of the isolate of *C. cassiicola* used in this work.

**Keywords:** target leaf spot, soybean, conidia, sporulation

## 1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill], é uma planta herbácea pertencente à família das Fabaceas. Geralmente é anual e suas variedades podem ser classificadas, quanto à duração do ciclo vegetativo, em: precoces, semiprecoces e tardias. Esta planta é originária do sudoeste asiático, e há relatos de seu cultivo há mais de 6 ou 7 mil anos na China. Nos dias atuais, a soja, é uma das mais importantes leguminosas cultivadas no mundo (GOMES, 1990; AZEVEDO, 1993; BORÉM, 1999).

A mancha-alvo é encontrada na maioria das áreas produtoras de soja do Brasil. É uma doença de importância na região do cerrado, onde ocorre com maior frequência e em caráter epidêmico.

Cultivares suscetíveis podem sofrer desfolha prematura, apodrecimento das vagens e manchas nas hastes. Através da infecção da vagem, o fungo atinge a semente e, desse modo, pode ser disseminado para outras áreas. A infecção, na região da sutura das vagens em desenvolvimento, pode resultar em necrose, abertura das vagens e germinação ou apodrecimento dos grãos ainda verdes (EMBRAPA / SOJA, 2003).

O agente causal da mancha-alvo é o fungo *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt.) Wei (syns. *Cercospora melonis* Cooke, *Cercospora vignicola* Kawamura, *Helminthosporium vignae* Olive, and *H. vignicola* (Kawamura) Olive) (SNOW & BERGGREN, 1989).

O patógeno produz conídios isolados ou em cadeia de dois a seis, cor parda, dilatados na base, retos ou ligeiramente curvos, com 3 a 20 septos, medindo 39-520 x 7-22  $\mu\text{m}$  (SNOW & BERGGREE, 1989; ELLIS, 1971;). São de coloração hialina a marrom, retos ou ligeiramente curvados, subcilíndricos, ligeiramente cônicos para o ápice, truncados no hilo basal, o qual mede de 4 - 8  $\mu\text{m}$  de largura. Apresentam de 3 a 20 pseudoseptos, retos ou ligeiramente curvados que medem 39 – 520 x 7 – 22 $\mu\text{m}$  (média 135 X 8 $\mu\text{m}$ ).

O micélio em meio de cultura é branco e flocoento, tornando-se mais tarde cinza escuro e constituindo de um emaranhado preto oliváceo. (SNOW & BERGGREE, 1989; ELLIS, 1971; SEAMAN et al, 1965). No entanto, Almeida et al. (1994) em um trabalho sobre diferenciação de isolados de *C. cassicola* afirma que o fungo se desenvolve vagarosamente em meio de cultura batata dextrose agar (BDA), formando um micélio de tonalidade escura e de coloração cinza-esverdeada.

O objetivo deste trabalho foi confirmar a identificação do isolado do agente causal da mancha-alvo da soja usado neste trabalho.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia – Micologia e em câmara de crescimento, da Faculdade de Agronomia e

Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo – RS em abril de 2008.

### **2.1 Multiplicação do inóculo**

O fungo utilizado nesse trabalho foi obtido de isolado de folhas de soja, oriundo de Primavera do Leste no ano de 2003, preservados na micoteca do Laboratório de Fitopatologia – Micologia da UPF.

Com auxílio de agulha histológica flambada, foram transferidos porções da colônia de *C. cassicola* preservada em tubo de ensaio, para placas de petri contendo meio de cultura BDA (200 g de batata, 15 g de sacarose e 12 g de ágar + 0,02g de sulfato de estreptomicina), preparado segundo Fernandez (1993). Essas placas permaneceram em câmara de crescimento a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  e com fotoperíodo de 12 horas durante 20 dias, até obter-se esporulação abundante.

### **2.2 Isolamento monospórico**

Após a esporulação do fungo, foi adicionado em cada placa de petri com colônias puras do fungo, 10mL de água destilada e esterilizada com a finalidade de obter-se uma suspensão de conídios. Em seguida, com auxílio de um pincel de pelo de camelo número 20 foi feita à remoção dos propágulos. Dessa suspensão foram pipetados 1,0mL para

placas de petri contendo ágar-água a 1%. As placas foram incubadas a  $25\pm 2^\circ\text{C}$  por fotoperíodo de 12 horas, durante 24 horas.

Em microscópio óptico, em magnitude de 100 vezes, observou-se a germinação dos conídios e realizou-se o isolamento monospórico. Com o auxílio de uma espátula esterilizada foram cortados pequenos cubos de ágar-água contendo um único conídio germinado. Cada cubo foi transferido para uma placa de petri (10 repetições) contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA). As placas foram incubadas a  $25\pm 2^\circ\text{C}$  e com fotoperíodo de 12 horas durante 20 dias até obter-se esporulação abundante.

### **2.3 Densidade de inóculo**

A concentração utilizada foi de  $40\times 10^3$  conídios. $\text{mL}^{-1}$ . Para ajustar essa densidade foi realizada a remoção dos esporos de placas de petri contendo colônias puras de *C. cassiicola*, com auxílio de pincel e água destilada e esterilizada, obtendo-se assim uma suspensão de conídios.

Dessa suspensão, com uso de micropipetador, ajustado para 0,01 mL, foi feita a contagem de 5 gotas em microscópio óptico determinando assim o número de conídios. $\text{mL}^{-1}$  de água.

Na suspensão foi adicionado uma gota de espalhante adesivo, Tween 20 (polioxietilenosorbitano) para melhorar a distribuição da suspensão do inóculo nas folhas de soja.

## **2.4 Inoculação em plantas de soja**

Plantas de soja do cultivar CD 219 RR foram cultivadas em vasos plásticos utilizando como substrato 2,0 kg de solo hortado. A densidade de semeadura usada foi de 10 sementes por vaso. Após a emergência, foi feita a eliminação de algumas plantas, permanecendo cinco plantas por recipiente. Os vasos foram mantidos em casa-de-vegetação para o desenvolvimento vegetativo das plantas.

Quando as plantas atingiram o estágio V4 -quarto nó, terceira folha trifoliolada aberta- (Embrapa 2004), foram transferidas para câmara climatizada com temperatura e fotoperíodo controlados, 25°C e fotoperíodo 12 horas.

Nesse ambiente foram inoculados cinco vasos contendo cada um cinco plantas, pela deposição da suspensão do inóculo com aspersor manual sobre as folhas de soja, até o ponto de escorrimento. Outros cinco vasos foram atomizadas apenas com água e mantidas sob as mesmas condições ambientais, servindo como testemunhas. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida por um período de 48 horas e temperaturas de 25°C. Ao término desse período, foram retiradas as câmaras úmidas e esperou-se uma semana até a manifestação dos sintomas.

## **2.5 Reisolamento do fungo de folhas de soja com sintoma da mancha-alvo**

Para completar o teste de patogenicidade reisolou-se o fungo das folhas inoculadas. Foram cortados 100 discos das folhas sintomáticas os quais foram submetidos a uma desinfestação durante três minutos com solução aquosa de hipoclorito de sódio a 1,0% e posteriormente lavados com água destilada e esterilizada para retirar o excesso de desinfetante. Os discos foram distribuídos em caixas de acrílico (11 x 11 x 3,5 cm de altura), contendo espuma de nylon e duas folhas sobrepostas de papel filtro, embebidas em água destilada e esterilizada. Essas caixas foram incubadas por 12 dias, em câmara de crescimento, até ocorrer a esporulação do fungo.

Além das câmaras úmidas, foram colocados 100 porções retangulares de folhas, que passaram pelo mesmo processo de assepsia descrito anteriormente, em 10 placas de petri contendo meio BDA, para esporular.

Após 12 dias foram contados e mensurados 200 conídios dos discos em câmara úmida e 200 conídios das porções retangulares de folhas de soja em meio de cultura.

## 2.6 Microcultura

Após o isolamento e desenvolvimento da colônia do fungo em meio de cultura BDA e esporulação em câmara úmida, foram preparadas lâminas através do processo de microcultura, com a finalidade de identificar o agente causal através de suas características morfológicas: forma, tamanho, número de células, cor dos conídios e coloração das colônias em meio de cultura.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos referem-se à contagem e mensuração de conídios de *C. cassicola* a partir de isolamento monospórico e de reisolamento de folhas sintomáticas.

Passado 20 dias após o isolamento monospórico foi realizada a contagem e mensuração de 200 conídios do fungo crescidos em meio de cultura BDA. O tamanho dos conídios variou de 8 -12 x 20-280  $\mu\text{m}$ , sendo a média de 10 x 150 $\mu\text{m}$ , resultados que assemelham-se com os obtidos por Snow & Berggren (1989), Ellis (1971) onde os conídios mensurados variaram entre 7-22 x 39-520 $\mu\text{m}$  com média de 8 x 135  $\mu\text{m}$ .

As plantas inoculadas, após o período de incubação (12 dias) apresentaram sintomas da mancha-alvo. Os sintomas da doença iniciaram por pontuações pardas, com halo amarelado, evoluindo para manchas

circulares, de coloração castanha, atingindo menos de 2 cm de diâmetro. As manchas apresentaram anéis concêntricos semelhantes a um alvo. Esses sintomas coincidem com os descritos por Almeida et al. (2005).

As plantas testemunhas, pulverizadas apenas com água, não apresentaram sintomas.

Os conídios retirados das lâminas de microcultura, ao microscópio óptico apresentaram morfologia idêntica a do gênero de *Corynespora*, isto é, conídios retos ou ligeiramente curvos, hialinos, subcilíndrico, truncado no hilo basal, a maioria com três septos transversais.

O fungo em meio de cultura BDA apresentou um crescimento e esporulação vagarosa, formando um micélio de tonalidade escura e de coloração cinza-esverdeada a preto oliváceo, semelhante aos dados descritos por Almeida et al (1994).

Na mensuração de 200 conídios oriundos da esporulação em folhas em câmara úmida obteve-se as seguintes medidas 8 -10 x 125 – 210µm, média de 9 x 167,5 µm. Para a mensuração de 200 conídios oriundos de porções retangulares de folhas sintomáticas isoladas em meio de cultura BDA as medidas foram 8-10 x 69 – 179µm, média de 9 x124 µm. Para as duas mensuração de conídios, os resultados foram assemelhan-se com os citados por Almeida et al (2005), Snow & Berggren (1989), Ellis (1971), 7-22 x 39- 520µm, média 8 x 135µm assemelha-se a *C. cassicola* (Berk & Curt.) Wei.

A identificação de *C. cassicola* foi confirmada por sua prova de patogenicidade, caracterização morfológica e pela comparação com descrições da espécie disponíveis na literatura.

#### **4 CONCLUSÃO**

Através dos sintomas produzidos nas inoculações, pela morfologia dos conídios obtidos no isolamento e no reisolamento do patógeno confirma-se que o fungo utilizado no presente trabalho trata-se de *C.cassicola*.

## CAPÍTULO II

### EFEITO DE SUBSTRATOS, LUZ E PAPEL DE FILTRO NA ESPORULAÇÃO DE *Corynespora cassiicola*

Márcia Muliterno de Melo<sup>1</sup> & Erlei Melo Reis<sup>2</sup>

**RESUMO** – O experimento foi realizado no Laboratório de Fitopatologia – Micologia, na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, com a finalidade de avaliar a esporulação de *Corynespora cassiicola* em diferentes substratos. Para isso foram usadas placas de petri com seis diferentes meio de cultura - Batata Dextrose Ágar (BDA), Solução Czapek Ágar, Alimento infantil, Malte Ágar, Farinha de aveia e suco V8 Ágar e quatro combinações (com luz e papel filtro, com luz sem papel filtro, sem luz com papel filtro e sem luz e sem papel filtro). O delineamento experimental usado foi fatorial triplo (substrato, luz/escuro, com ou sem papel filtro). Na avaliação de esporulação do fungo, foram cortados dois discos de 0,241cm<sup>2</sup> em cada placa dos diferentes substratos e colocados em tubos de ensaio contendo 10mL de água destilada. Esses tubos foram agitados e de cada um foram

---

<sup>1</sup> Engenheira Agrônoma, mestranda do programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração em Fitopatologia. marciamuliterno@gmail.com

<sup>2</sup> Orientador, Engenheiro Agrônomo, Ph.D., professor da FAMV/ PPGAgro/UPF. erleireis@tpo.com.br

retiradas três alíquotas de 10 $\mu$ L para contagem de conídios no microscópio óptico. Os dados foram transformados em número de esporos.cm<sup>2</sup>. A maior esporulação do fungo foi obtida com o substrato Solução Czapek-Ágar, com luz fotoperíodo de 12 horas e sobreposição de papel filtro.

**Palavras- chave:** Produção de inóculo, meio de cultura, regime de luz

#### **EFFECT OF SUBSTRATES, LIGHT AND FILTER PAPER ON THE SPORULATION OF *Corynespora cassicola***

**ABSTRACT-** The experiment was conducted at the Laboratory of Plant - Mycology in the School of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Passo Fundo, in order to assess the sporulation of *Corynespora cassicola* on different substrates. In this Petri dishes were used with six different means of culture - Potato Dextrose Agar (PDA), Czapek Solution Agar, infant food, Malt Agar, Oat Meal Agar and V8 juice and four combinations (with light and filter paper with light without filter paper, filter paper with no light and no light and no filter paper). The experimental design was factorial triple (substrate, light / dark, with or without filter paper). In the assessment of sporulation of the fungus were cut two disks of 0241cm<sup>2</sup> on each plate of different substrates and placed in test tubes containing 10mL of distilled water. These tubes were

agitated L for counting conidia in  $\mu\text{m}^2$  and were removed from each three aliquots of 10 optical microscope. The data were converted into number of esporos. $\text{cm}^2$ . The highest sporulation of the fungus was obtained with the substrate solution Czapek-Agar, with photoperiod of 12 hours light and overlapping filter paper.

**Keywords:** Production of inoculum, culture medium, the light

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, sendo superado apenas pelos Estados Unidos. A produção brasileira de soja somou, na safra 2007/2008, 60 milhões de toneladas, superando em 2,8 % a do ano anterior. A área colhida foi de 21 mil ha. Na média nacional, o rendimento da soja foi de 2,8  $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ , 18,3% maior que os 2,3  $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  registrados em 2006/2007, em razão das condições climáticas mais favoráveis e da priorização do plantio pelos produtores nas áreas mais aptas ao cultivo. Os principais estados produtores no Brasil são Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul (CONAB, 2009).

A mancha-alvo, causada por *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt.) Wei, é encontrada em todas as áreas produtoras de soja do Brasil. É uma doença de grande importância na Região do Cerrado, onde ocorre com maior frequência. Ocorrência da doença têm sido observada

esporadicamente, desde as zonas mais frias do Sul às chapadas dos Cerrados (EMBRAPA / SOJA 2003).

Conforme Seaman et al. (1965), os conídios do fungo são produzidos facilmente sobre uma vasta gama de temperatura em meio de cultura BDA ou Czapek Agar, produzindo tubos germinativos em uma ou em ambas extremidades.

Almeida & Yamashita (1976) observaram o crescimento e esporulação do fungo em diferentes meios de cultura, e concluíram que nos meios suco V-8 e alimento infantil o fungo obteve melhor esporulação.

O objetivo desse trabalho foi quantificar a esporulação de *C. cassicola* em diferentes substratos, contendo ou não papel filtro, submetidos a luz ou escuro, através no número de esporos.cm<sup>2</sup>.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fitopatologia-Micologia e em câmara de crescimento, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, no período de abril de 2008.

O delineamento experimental usado foi fatorial triplo 6x2x2 (substratos x luz/escuro x com/sem papel filtro), com cinco repetições, distribuídas ao acaso.

Os substratos usados foram: **1) Solução Czapek Ágar-** 3g  $\text{NaNO}_3$ , 1g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5g  $\text{MgSO}_4$ , 0,5g KCl, 0,01g  $\text{FeSO}_4$ , 30g sacarose, 15g ágar, 0,2g estreptomicina, 1L água destilada (TUIITE,1969); **2) Farinha de aveia Ágar-** 72,5g farinha de aveia e ágar, 0,2g estreptomicina, 1L água destilada (meio de cultura pronto oatmeal, produto de SIGMA); **3) Malte Ágar-** 20g extrato malte, 1g peptona, 20g dextrose, 20g ágar, 0,2g estreptomicina, 1L água destilada (TUIITE, 1969); **4) Suco V8 Ágar-** 200ml suco V-8 (contém suco de tomate, mistura de sucos vegetais: cenoura, aipo, beterraba, salsa, alface, agrião e espinafre, sal, antioxidante, ácido ascórbico, acidulante ácido cítrico e aromatizante. Produto de Campbell Soup Co.), 3g  $\text{CaCO}_3$ , 15g ágar, 0,2g estreptomicina, 1L água destilada (TUIITE,1969); **5) Alimento infantil-** 10g alimento infantil (contém água, cenoura, batata, feijão, cebola, chuchu, óleo de milho, polpa de tomate, leite desnatado, soro de leite, óleo de canola, amido, farinha de arroz, beterraba, sal. Produto de Nestlé Brasil Ltda), 15g ágar, 0,2g estreptomicina, 1L água destilada (ALMEIDA, 1976) e **6) BDA-** 200g de batatas, 17g dextrose, 15g ágar, 0,2g estreptomicina, 1L água destilada (TUIITE, 1969).

Primeiramente foram preparadas 20 placas de petri com cada meio de cultura, sendo que em 10 placas, foi colocado uma folha de papel filtro, germinex, do tipo de papel filtro usado para teste de germinação, sobre o substrato, com a finalidade de serem usadas para os tratamentos com papel filtro sobre o substrato. Outras 10 placas de petri com cada

meio de cultura, nas quais não foi adicionado papel filtro, foram usadas para os tratamentos sem papel filtro no substrato.

Com auxílio de pincel de pelo de camelo número 20, foi realizada a remoção dos esporos de seis placas de petri, contendo colônias puras de *C. cassiicola*, para um erlenmeyer contendo 300mL de água destilada e esterilizada e uma gota de espalhante adesivo, Tween 20 (polioxietilenosorbitano). Dessa suspensão, foi pipetado 10 $\mu$ m e preparada uma lâmina para contar o número de conídios existente em gota de volume conhecido, esse procedimento foi realizado 4 vezes, com a finalidade de se obter o número de conídios.mL<sup>-1</sup> de água.

Em placas de petri, contendo os substratos, com auxílio de micropipetador foi colocado 1mL da suspensão de conídios por placa.

Os tratamentos com luz, com e sem papel filtro no substrato foram distribuídos ao acaso, em câmara de crescimento, com lâmpadas OSRAM Universal, 40 watts, fotoperíodo 12 horas a 25 $^{\circ}$  $\pm$  2 $^{\circ}$ C. As placas de tratamentos escuro, com e sem papel filtro no substrato, foram envolvidos em papel alumínio e distribuídos ao acaso, em um local fechado, dentro da câmara de crescimento para terem a mesma temperatura dos outros tratamentos.

O material permaneceu em câmara de crescimento por 15 dias.

Em tubos de ensaio, contendo 10 mL de água destilada e esterilizada com espalhante adesivo (Tween 20), foram adicionados dois discos recortados do substrato, de área 0.241cm<sup>2</sup>, com micélio do fungo, para quantificar a esporulação de *C. cassiicola*. Os tubos foram agitados

em agitador manual (vortex) e retiradas três alíquotas de 10 $\mu$ L, as quais foram depositadas em lâminas microscópicas e, por varredura sob microscópio óptico, foram contados conídios existentes.

Os dados foram transformados em número de esporos. cm<sup>2</sup> e foram submetidos a análise da variância e ao teste de comparação de médias, Tukey 5%.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A maior esporulação ocorreu no substrato Solução Czapek-ágar, com fotoperíodo de 12 horas de luz, e papel filtro sobreposto ao meio de cultura, diferindo significativamente dos demais tratamentos (Tabela 1).

Todos os outros substratos testados tiveram esporulação no tratamento com luz fotoperíodo de 12 horas e papel filtro, tendo diferença significativa dos tratamentos que permaneceram no escuro.

Também ocorreu boa esporulação dos substratos BDA e Malte ágar. Suco V-8 ágar, Farinha de aveia e alimento infantil tiveram a menor esporulação do inóculo, e não diferiam entre si.

Tabela 1 – Influência de substratos sobre a esporulação de *Corynespora cassiicola* (nº conídios.cm<sup>2</sup>), na presença e ausência da luz, e, com e sem sobreposição de papel filtro. Passo Fundo, RS. 2009.

Substrato	LUZ				ESCURO				C.V (%)				
	Com papel		Sem papel		Com papel		Sem papel						
<b>Alimento infantil</b>	A	30,27	d	B	12,18	cd	BC	9,13	b	C	1,33	bc	<b>31,3</b>
<b>BDA</b>	A	212,63	b	B	17,66	c	BC	12,07	a	C	2,54	bc	<b>10,2</b>
<b>Czapek Ágar</b>	A	297,63	a	B	138,20	a	C	1,21	c	C	5,97	c	<b>13,4</b>
<b>Farinha de aveia</b>	A	46,94	d	B	3,03	d	B	3,80	c	B	3,62	ab	<b>27,1</b>
<b>Malte Ágar</b>	A	147,92	c	B	40,45	b	B	6,80	b	B	5,18	a	<b>35,9</b>
<b>Suco V-8</b>	A	13,87	d	B	1,68	d	B	1,19	c	B	4,87	c	<b>43,8</b>
<b>Média</b>	A	124,88		B	35,54		C	5,70		C	3,91		
	A		80,21				B		4,80				
<b>C.V (%)</b>		<b>15,8</b>			<b>15,3</b>			<b>21,2</b>			<b>45,8</b>		

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

Para o tratamento com luz e sem papel filtro no meio, Solução Czapek-ágar diferiu significativamente de todos os outros meios usados. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Olive et al. (1945), onde os autores obtiveram excelente esporulação do fungo nos meios solução

Czapek Ágar e BDA. No entanto, esses resultados diferem dos obtidos por Almeida & Yamashita (1976), onde as melhores esporulações do fungo ocorreram nos meios suco V8 Ágar e alimento infantil. Essa diferença de esporulação no substrato alimento infantil pode estar relacionada a composição do alimento usado para fazer o substrato. Almeida & Yamashita usaram alimento infantil da marca Gerber, enquanto nesse trabalho o alimento infantil usado foi da marca Nestlé. Tal diferença de esporulação pode ter ocorrido também devido não se tratarem dos mesmos isolados de *C. cassicola*.

Para os tratamentos realizados no escuro, indiferente da presença de papel filtro, a solução Czapek-ágar e suco V8-ágar resultaram nas menores esporulações do fungo. No tratamento escuro com papel a melhor esporulação foi em BDA e no tratamento escuro sem papel foi em malte ágar.

Em todos os substratos testados a presença de luz contínua favoreceu a esporulação quando em comparação com dados obtidos na ausência de luz. Esses dados assemelham-se aos obtidos por Almeida & Yamashita (1976). De acordo com Onesirosan et al. (1975), a presença de luz favorece a esporulação desse fungo, embora certos isolamentos testados tenham esporulado mais que outros.

A presença de papel filtro promoveu maior esporulação em todos os tratamentos. Conforme Reis, (1973), o aumento da superfície de contato, conferida pelo papel de filtro, pode ser responsável pela maior esporulação.

#### **4 CONCLUSÃO**

O melhor substrato para esporulação de *C. cassicola* foi a solução Czapek Ágar, na presença de luz fotoperíodo de 12 horas, e, com sobreposição de papel filtro ao meio.

### CAPÍTULO III

## LIMIARES TÉRMICOS E TEMPERATURA ÓTIMA PARA A GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE *Corynespora cassiicola* EM MEIO DE CULTURA

Márcia Muliterno de Melo<sup>1</sup> & Erlei Melo Reis<sup>2</sup>

**RESUMO** – Em experimento realizado no Laboratório de Fitopatologia – Micologia e incubadora tipo BOD, na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, determinou-se a temperatura ótima, o limiar térmico inferior e o superior para germinação de esporos de *Corynespora cassiicola*. Em placas de petri, com meio de cultura Czapek ágar, foi colocado 1mL de uma suspensão de conídios do fungo. As placas foram incubadas com temperaturas controladas (6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 36, 38, 39, 40 e 41°C) e retiradas a intervalos de 6, 12 e 24 horas. O delineamento experimental usado foi fatorial duplo 2x2 (temperaturas x tempo exposição). Para cada tratamento foram mantidas quatro repetições as quais foram distribuídas ao acaso. Quando as placas foram retiradas da incubadora, foi adicionado uma suspensão de

---

<sup>1</sup> Engenheira Agrônoma, mestranda do programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração em Fitopatologia. marciamuliterno@gmail.com

<sup>2</sup> Orientador, Engenheiro Agrônomo, Ph.D., professor da FAMV/ PPGAgro/UPF. erleireis@tpo.com.br

acetona e azul de algodão, para paralisar a germinação dos esporos e colorir o fungo. Todas as placas foram visualizadas em microscópio óptico, com magnitude de 100 vezes. A temperatura ótima para a germinação de *C. cassiicola* foi de 23°C, a mínima foi 7°C e a máxima 39°C.

**Palavras-chave:** Limiar térmico, fungo, germinação esporos

**THERMAL THRESHOLDS AND OPTIMAL TEMPERATURE  
FOR GERMINATION OF CONIDIA OF *Corynespora cassiicola* IN  
CULTURE MEDIUM**

**ABSTRACT** – In an experiment conducted at the Laboratory of Plant - Mycology and type BOD incubator, at the Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Passo Fundo, it was determined the optimal temperature, the lower and upper thermal threshold for germination of spores of *Corynespora cassiicola*. In Petri dishes with Czapek medium with agar, was placed 1mL of a suspension of conidia of the fungus. The plates were incubated with controlled temperatures (6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 36, 38, 39, 40 and 41 ° C) and withdrawn at intervals of 6, 12 and 24 hours. The experimental design was 2x2 factorial double (temperature x exposure time). For each treatment four replicates were kept which were distributed randomly. When the plates were removed from the incubator, was added a suspension of acetone and blue

cotton, to paralyze the germination of the fungus spores and coloring. All plates were viewed under optical microscope, with magnitude of 100 times. The optimum temperature for germination of *C. cassicola* was 23 ° C, the minimum was 7 ° C and maximum 39 ° C.

**Keywords:** Ideal thresholds, fungus, spore germination

## 1 INTRODUÇÃO

Devido a sua grande adaptabilidade a diferentes latitudes, solos e condições climáticas, a soja é uma planta rústica, porém, seu potencial de produtividade dificilmente é alcançado por não serem tomados alguns cuidados essenciais.

Entre as doenças que afetam a soja, uma que vem crescendo em importância é a mancha-alvo, causada pelo fungo: *Corynespora cassicola* (Berk. & Curt.) Wei.

O primeiro relato do patógeno na cultura da soja foi nos Estados Unidos, em 1945, por OLIVE et al., (1945).

No Brasil, de acordo com Almeida et al. (1976), foi relatada pela primeira vez por YORINORI no estado do Paraná, e por ALMEIDA no estado de São Paulo.

Segundo Seaman et al., (1965) a temperatura para o desenvolvimento do patógeno é de 18 a 21°C (min 7°C e máx 39°C).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a germinação de conídios de *C. cassiicola* em diferentes temperatura para obter os limiares térmicos inferior e superior, e a temperatura ótima.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fitopatologia-Micologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, no período de maio/ junho de 2008.

Utilizando o meio de cultura onde o fungo apresentou melhor esporulação – Czapek Ágar, foram testadas seis temperaturas intermediárias (10, 15, 20, 25, 30 e 35°C), seis temperaturas mínimas (5, 6, 7, 8, 9 e 10°C) e seis temperaturas máximas (36, 37, 38, 39, 40 e 41°C), e três tempos de exposição (6, 12 e 24 horas). O delineamento usado foi um fatorial duplo 2x2 (temperaturas x tempo exposição). Para cada tratamento foram mantidas quatro repetições as quais foram distribuídas ao acaso.

Com auxílio de pincel de pelo de camelo número 20 e 300mL de água destilada e esterilizada, foi feita raspagem em placas de petri contendo culturas puras de *C. cassiicola*, para obter-se uma suspensão de conídios. Em seguida foram contadas três gotas de 10 µL no microscópio óptico para se obter uma média da quantidade de conídios existentes em 1mL de água.

Com a suspensão ajustada para  $5 \times 10^3$  esporos.mL<sup>-1</sup> de água foi pipetado 1mL em placas de petri, contendo meio de cultura Czapeck-ágar. Essas placas foram mantidas em incubadora BOD - Biological oxygen demand, com diferentes temperaturas, e retiradas a cada 6, 12 e 24 horas de exposição.

Após a remoção das placas de petri da incubadora, foi adicionado as placas uma suspensão de acetona com azul de algodão para paralisar a germinação dos esporos e colorir o fungo.

Esse procedimento foi repetido para cada uma das temperaturas testadas.

A germinação dos conídios foi avaliada em microscópio óptico pela varredura da placa, observando 100 esporos por repetição. Considerou-se germinado o conídio que apresentou o tubo germinativo mais longo do que sua maior largura (Zadocks & Schein, 1979).

Os dados foram submetidos a análise da variância, ao teste de comparação de médias Tukey 5%, e de regressão.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

De acordo com a análise da variância, houve interação entre temperatura, tempo de exposição e germinação de conídios (Figura 1).

No tempo de exposição de 24 horas ocorreu a maior germinação de conídios, seguida do tempo 12 horas e depois 6 horas, havendo

diferença estatística entre os tempos. Logo, quanto maior for o tempo de exposição dos conídios, maior é a germinação.

O patógeno mostrou um comportamento crescente de germinação de conídios até 25 °C para todas as temperaturas e tempos de exposição. Esse comportamento decresceu até 39°C, paralisando a germinação do fungo.

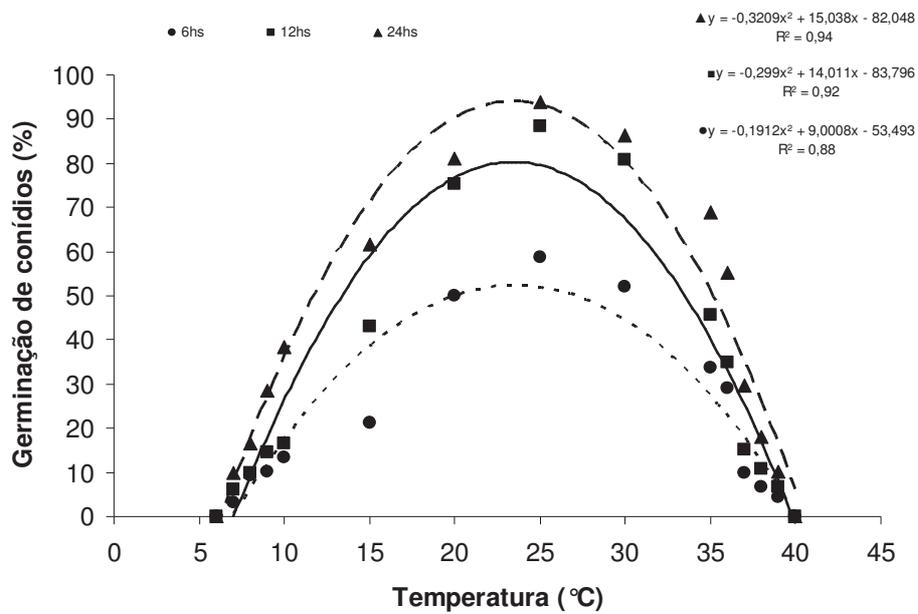


Figura 1- Relação da germinação de conídios de *Corynespora cassiicola* em função da temperatura, em três tempos de exposição. Passo Fundo, RS. 2009.

Conforme as equações geradas no gráfico calculou-se que a temperatura ótima para a germinação de *C. cassiicola* é de 23°C, em todos os tempos de exposição. Este resultado discorda do obtido por Seaman et al., (1965) que consideram a temperatura ótima para o desenvolvimento de *C.cassiicola* de 18 a 21°C.

No entanto, os esporos do fungo germinaram de 7 a 39°C, sendo seu limiar térmico inferior 7°C e o limiar térmico superior 39°C, esses resultados foram idênticos aos obtidos por Seaman et al., (1965).

Esse trabalho tem como utilidade prática provar que os esporos do fungo *C. cassiicola* conseguem germinar em uma vasta gama de temperaturas, tornando o controle mais difícil. Apesar de conseguir se desenvolver em extremos de temperaturas, as temperaturas que tem o maior potencial de germinação variam de 20 a 30 °C, sendo esse um dos motivos da doença se manifestar com maior intensidade na região central do Brasil.

#### **4 CONCLUSÃO**

A temperatura ótima para a germinação de conídios de *C.cassiicola* é de 23°C.

Os esporos do patógeno germinam em uma ampla gama de temperatura, sendo seu limiar térmico inferior 7°C e o limiar térmico superior 39°C.

## CAPÍTULO IV

### REAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA A *Corynespora cassiicola*

Márcia Muliterno de Melo<sup>1</sup> & Erlei Melo Reis<sup>2</sup>

**RESUMO** - Em experimento conduzido em Laboratório, casa-de-vegetação e câmara climatizada, na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, foi avaliada a reação de cultivares de soja a *Corynespora cassiicola*. Foram usados 10 cultivares de soja (BMX Apolo, BMX Potência, BRS 243 RR, BRS 255 RR, CD 214 RR, CD 219 RR, Fundacep 56 RR, Fundacep 59 RR, Pioneer P98C11, Pioneer P98R31,) cada um com 5 repetições. Cada vaso constou de cinco plantas, cada planta com três trifólios no estágio V4. O delineamento usado foi inteiramente casualizado. Uma suspensão de  $25 \times 10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup> de *C. cassiicola* foi inoculada por aspersão nas plantas de soja, e em seguida foram colocados sacos plásticos umedecidos para que as plantas permanecessem em câmara úmida. Após 48 horas em câmara climatizada com temperatura de  $\pm 25^\circ\text{C}$ , os sacos plásticos foram retirados e as plantas foram levadas para casa-de-vegetação. Passados 15

---

<sup>1</sup> Engenheira Agrônoma, mestranda do programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração em Fitopatologia. marciamuliterno@gmail.com

<sup>2</sup> Orientador, Engenheiro Agrônomo, Ph.D., professor da FAMV/ PPGAgro/UPF. erleireis@tpo.com.br

dias da inoculação foram realizadas as avaliações. O cultivar mais suscetível ao número de lesão por folíolo foi BRX Potência, e ao diâmetro de lesão, BRX Apolo. Fundacep 56 e 59 foram os cultivares mais resistentes ao patógeno, tanto para número quanto para diâmetro de lesão.

**Palavras-chave:** mancha-alvo, resistência, suscetibilidade

#### **REACTION SOYBEAN CULTIVARS TO *Corynespora cassiicola***

**ABSTRACT-** In an experiment conducted in laboratory, home-de-vegetation and climatic chamber, at the Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Passo Fundo, was performed to evaluate the reaction of soybean cultivars to *Corynespora cassiicola*. We used 10 soybean cultivars (Apollo BMX, BMX Power, BRS 243 RR, BRS 255 RR, RR 214 CD, RR 219 CD, Fundacep 56 RR, 59 RR Fundacep, P98C11 Pioneer, Pioneer P98R31,) each with 5 replicates. Each pot consisted of five plants, each with three plants in trefoil stage V4. The design used was completely randomized. A suspension of  $25 \times 10^{-13}$  conídios.mL of *C. cassiicola* was inoculated by spraying on the soybean plants, and then were placed in moistened plastic bags that the plants remain in a moist chamber. After 48 hours in a climatic chamber with temperature of  $\pm 25$  ° C, the bags were removed and the plants were taken to home-de-vegetation. After 15 days of inoculation were the

evaluations. The cultivar most susceptible to the number of lesions per leaflet was BRX Power, and the diameter of lesion, BRX Apollo. Fundacep 56 and 59 were the most resistant cultivars to the pathogen, both in number and to diameter of lesion.

**Keywords:** target spot, resistance, susceptibility

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja é originária do sudoeste asiático, e há relatos de seu cultivo há mais de 6 ou 7 mil anos na China. Nos dias atuais, a soja, é uma das mais importantes leguminosas cultivadas no mundo (GOMES, 1990; AZEVEDO, 1993; BORÉM, 1999).

Os sintomas da mancha alvo em folhas de soja surgem como anéis concêntricos, com um halo amarelo que crescem até dois centímetros de diâmetro e tornam-se circulares de coloração parda. O nome da doença se deve às pontuações mais escuras no centro e halos amarelos presentes nas manchas, que lembram o formato de um alvo (SNOW & BERGGREN, 1989).

Para que ocorra a infecção na folha, a umidade relativa do ar deve ser igual ou maior que 80%, sendo que o déficit hídrico inibe o crescimento do fungo (SNOW & BERGGREN, 1989).

Conforme Almeida et al (2005) o uso de cultivares resistentes é a primeira medida para o controle da mancha-alvo na cultura da soja, seguido por tratamento de sementes, rotação de culturas com milho e espécies de gramíneas e controle com fungicida. Alguns trabalhos sobre reação de cultivares de soja a mancha alvo já foram desenvolvidos no Brasil, no entanto, nenhuma metodologia específica foi descrita.

Devido à falta de informações sobre resistência de cultivares a *Corynespora cassiicola*, o objetivo desse trabalho foi avaliar a resistência de dez cultivares de soja, por meio de contagem do número de lesão por folíolo e do diâmetro dessas lesões.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia-Micologia, em casa-de-vegetação e em câmara climatizada, nas dependências da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo – RS, no período de outubro-novembro de 2008.

### **2.1 Cultivo das plantas**

Foram cultivados em vasos plásticos, dez cultivares de soja (BMX Apolo, BMX Potência, BRS 243 RR, BRS 255 RR, CD 214 RR,

CD 219 RR, Fundacep 56 RR, Fundacep 59 RR, Pioneer P98C11 e Pioneer P98R31) utilizando como substrato 2,0 Kg de solo hortado em cada vaso. A densidade de sementeira usada foi de 10 sementes por vaso. Após a emergência das plântulas, foram deixadas apenas cinco plantas por vaso. Os vasos foram mantidos em casa-de-vegetação para o desenvolvimento das plantas. Quando atingiram o estágio vegetativo V4 - quarto nó, terceira folha trifoliolada aberta, (apud Henning, et al., 2005), foram transferidas para câmara climatizada com temperatura e fotoperíodo controlado de 25°C e 12 horas de luz.

## **2.2 Produção do inóculo**

O inóculo utilizado nesse trabalho foi obtido de isolados de folhas de soja, oriundos de Primavera do Leste no ano de 2003, preservados na micoteca do Laboratório de Fitopatologia – Micologia da UPF.

Com auxílio de agulha histológica flambada, foram transferidos fragmentos da colônia de *C. cassicola* preservada em tubos de ensaio, para placas de petri contendo meio de cultura BDA (200 g de batata, 15 g de sacarose e 12 g de ágar + 200 ppm de sulfato de estreptomicina), preparado segundo Fernandez (1993). Essas placas permaneceram em câmara de crescimento a 25±2C e fotoperíodo de 12 horas durante 20 dias, até obter-se esporulação abundante.

### **2.3 Preparo da suspensão de inóculo**

A partir das culturas puras esporuladas, preparou-se uma suspensão de conídios em água destilada e esterilizada + polioxietilenosorbitano (Tween 20 duas gotas por litro). A densidade de inóculo foi determinada contando-se o número de conídios em 0,01mL, vertida numa lâmina e por varredura examinada ao microscópio. A concentração utilizada para a inoculação das plantas foi ajustada para  $25 \times 10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup>.

### **2.4 Inoculação das plantas**

A inoculação foi realizada por aspersão das suspensões do inóculo com aspersor manual sobre os folíolos de soja, no estágio V4, até o ponto de escorrimento.

### **2.5 Incubação**

Após a inoculação, as plantas foram mantidas molhadas, cobertas por sacos plásticos individuais para cada tratamento. Nessa fase, o material permaneceu em câmara climatizada com temperatura de 25°C por 48 horas. Ao término deste período, as plantas foram transferidas para casa-de-vegetação onde permaneceram por 15 dias até a avaliação.

## 2.6 Avaliações

As avaliações foram realizadas 15 dias após a incubação, quantificando-se a intensidade da mancha-alvo em folíolos de soja. Para isso, foi contado o número de lesão por folíolo e o diâmetro das lesões.

Os dados foram submetidos a análise de normalidade da variância e as medias comparadas por Tukey.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando as reação de cultivares, observa-se que não foram identificados cultivares imunes a *C. cassicola*. Quando inoculados, os cultivares apresentaram sintomas (Tabela 1).

Quanto ao número de lesão por folíolo o cultivar BMX Potência foi o mais suscetível (15,6%), no entanto, não diferiu estatisticamente de P98R31 (12,6%), CD 214 (8,8%) e CD 219 (9,8%). Fundacep 59 foi o cultivar mais resistente ao número de lesão pro folíolo (3,4 %), mas não teve diferença significativa de Fundacep 56 (4,6%) e P98C11(5,6%).

Para o diâmetro de lesão, BMX Apolo (2,7%) foi o cultivar mais suscetível, mas estatisticamente não diferiu de BRS 243 (2,4%), P98R31 (2,4%), P98C11 (2,3%), CD 214 (2,2%) e BMX Potencia (2,2%). O cultivar mais resistente foi Fundacep 59 (1,6%)

Almeida & Yamashita, (1978), testaram a reação de três cultivares de soja a *C. cassicola* e concluíram que todas foram suscetíveis.

Tabela 1 - Reação de cultivares de soja à inoculação de *Corynespora cassicola* em casa-de-vegetação. Passo Fundo, RS. 2009.

Lesão por folíolo (n°)			Diâmetro de lesão por folíolo (mm)		
Cultivares	Média		Cultivares	Média	
BMX Apolo	7,2	bc	BMX Apolo	2,7	a
BMX Potência	15,6	a	BMX Potência	2,2	abcd
BRS 243	5,8	bc	BRS 243	2,4	ab
BRS 255	6,8	bc	BRS 255	1,8	cd
CD 214	8,8	abc	CD 214	2,2	abc
CD 219	9,8	abc	CD 219	2,0	bcd
Fundacep 56	4,6	c	Fundacep 56	2,0	bcd
Fundacep 59	3,4	c	Fundacep 59	1,6	d
P98C11	5,6	c	P98C11	2,3	abc
P98R31	12,6	ab	P98R31	2,4	ab
<b>C.V. (%)</b>	<b>40,4%</b>		<b>C.V. (%)</b>	<b>11,8%</b>	

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade do erro.

Roim (2001), em Jaboticabal –SP, testou a reação de 350 cultivares de soja à mancha-alvo. As avaliações dos sintomas de mancha alvo nas folhas de soja inoculadas foram feitas com base na escala de severidade da mancha alvo, considerando os níveis de infecção e a porcentagem de área foliar infectada. Os resultados entre os cultivares avaliados foram de 122 cultivares resistentes, 159 cultivares

moderadamente resistentes, 62 cultivares moderadamente suscetíveis e 7 cultivares suscetíveis.

Nesse trabalho pode-se notar que o número de lesões por folíolo variou bem mais que o diâmetro das lesões, sendo que na literatura encontra-se que as lesões podem chegar até 20mm de diâmetro e nesse experimento elas não ultrapassaram 3mm. Isso pode ser explicado pelo mecanismo de defesa das plantas, no caso da resistência, ou seja, as plantas de soja não foram capazes de impedir a penetração do fungo no seu tecido, explicando a diferença entre o número de lesões/folíolo, no entanto, conseguiram restringir a colonização desse patógeno, por isso o diâmetro das lesões não variou muito.

Dessa forma, as plantas consideradas resistentes nesse trabalho foram capazes de tolerar a presença do parasita, impedindo através de seus mecanismos de defesa que esse patógeno colonizasse seus tecidos.

#### **4 CONCLUSÃO**

Entre os cultivares avaliados, o mais suscetível considerando-se o número de lesão por folíolo foi BRX Potência, e quanto ao diâmetro de lesão, BRX Apolo.

Fundacep 56 e Fundacep 59 foram os cultivares mais resistentes, tanto para número de lesão quanto para diâmetro de lesão.

Não foram encontrados cultivares imunes a mancha alvo da soja entre os cultivares testados.

## CAPÍTULO V

### EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE INÓCULO DE *Corynespora cassiicola* NA INTENSIDADE DA MANCHA ALVO EM SOJA

Márcia Muliterno de Melo<sup>1</sup> & Erlei Melo Reis<sup>2</sup>

**RESUMO** – Em experimento conduzido em Laboratório, casa-de-vegetação e câmara climatizada, na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, foi realizada a quantificação do efeito de diferentes concentrações de inóculo de *Corynespora cassiicola* sobre a intensidade da mancha alvo em folíolos de soja. Foram utilizadas as concentrações de conídios:  $5 \times 10^3$ ,  $15 \times 10^3$ ,  $25 \times 10^3$ ,  $35 \times 10^3$  e  $45 \times 10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup>. Em cada tratamento foram inoculados 225 folíolos de soja do cultivar CD 219 RR, suscetível a mancha-alvo. Após a inoculação por aspersão do inóculo sobre os folíolos, no estádio V4, foram colocados sacos plásticos para manter as plantas em câmara úmida. O experimento foi conduzido em câmara climatizada, por 48 horas de incubação e temperatura de 25°C. As avaliações foram feitas aos sete dias

---

<sup>1</sup> Engenheira Agrônoma, mestranda do programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração em Fitopatologia. marciamuliterno@gmail.com

<sup>2</sup> Orientador, Engenheiro Agrônomo, Ph.D., professor da FAMV/ PPGAgro/UPF. erleireis@tpo.com.br

após a inoculação. A concentração de  $35 \times 10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup> causa uma intensidade satisfatória da doença para ser utilizado em trabalhos futuros.

**Palavras-chave:** *Glycine max*, densidade de inóculo, severidade de mancha alvo.

**EFFECT OF CONCENTRATION OF INOCULUM OF *Corynespora cassiicola* THE INTENSITY OF CHANNEL TARGET IN SOYBEAN**

**ABSTRACT-** In an experiment conducted in laboratory, home-de-vegetation and climatic chamber, at the Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Passo Fundo, was performed to quantify the effect of different concentrations of inoculum of *Corynespora cassiicola* on the intensity of the target spot on leaves soybean. We used concentrations of conidia:  $5 \times 10^3$ ,  $15 \times 10^3$ ,  $25 \times 10^3$ ,  $35 \times 10^3$  and  $45 \times 10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup>. In each treatment were inoculated leaflets 225 of the soybean cultivar CD 219 RR, susceptible to spot the target. After inoculation by spraying the inoculum on the leaves, in the V4, were placed plastic bags to keep the plants in a moist chamber. The experiment was conducted in a climatic chamber for 48 hours of incubation and temperature of 25 ° C. The animals were sacrificed seven days after inoculation. The concentration of  $35 \times 10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup> causes a satisfactory intensity of the disease to be used in future work.

**Keywords:** *Glycine max*, inoculum density and severity of target spot.

## 1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill], é uma planta herbácea pertencente à família das Fabaceas. O primeiro registro de cultivo de soja no Brasil, data de 1914, no município de Santa Rosa, RS. Entretanto, a expansão da soja no Brasil aconteceu nos anos 70, com o interesse da indústria de óleo e a demanda do mercado internacional.

A mancha-alvo ocorre no final do ciclo da soja, causando prejuízos econômicos. No entanto, se trata de uma doença potencialmente destrutiva em cultivares suscetíveis em épocas de elevada precipitação pluvial (PHILLIPS, 1989).

Almeida & Yamashita (1978) testaram duas técnicas de inoculação de *Corynespora cassiicola* em três cultivares de soja, a primeira foi inocular por aspersão uma suspensão do inóculo nas folhas e a segunda, verter junto ao hipocótilo das plantas uma suspensão de conídios. Ambas as técnicas promoveram a infecção das plantas, sendo que os sintomas apareceram mais rápido quando a inoculação foi por aspersão. Nessa técnica as concentrações de conídios usadas foram de  $25 \times 10^3$ ,  $50 \times 10^3$  e  $100 \times 10^3$  esporos.mL<sup>-1</sup>. Na maior concentração houve grande coalescência de lesões, dificultando a avaliação por subestimar a resistência da planta, por esse motivo, a concentração de  $50 \times 10^3$  esporos.mL<sup>-1</sup> foi apontada como a indicada para ser usada em trabalhos de melhoramento.

No mesmo trabalho, Almeida & Yamashita (1978), testaram também o melhor período de incubação para o inóculo e concluíram que mantendo as plantas cobertas com sacos plásticos por 48 horas com umidade relativa saturada a infecção obtida foi satisfatória.

Em fitopatologia, diferentes intensidades da doença podem ser geradas com diferentes concentrações de inóculo, diferentes temperaturas, distintas durações de período de molhamento, reação de cultivares e variação da agressividade ou virulência do patógeno (Zadoks & Schein, 1979).

Devido às poucas informações sobre uma concentração para a seleção de material de *C.cassicola* capaz de causar infecção na cultura da soja, esse trabalho teve como objetivo quantificar o efeito de diferentes concentrações de inóculo sobre a intensidade da doença em folíolos de um cultivar de soja.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia-Micologia, em casa-de-vegetação e em câmara climatizada, nas dependências da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo – RS, no período de novembro a dezembro de 2008.

O presente trabalho constou de seis tratamentos, envolvendo diferentes concentrações de conídios ( $5 \times 10^3$ ,  $15 \times 10^3$ ,  $25 \times 10^3$ ,  $35 \times 10^3$  e

$45 \times 10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup>) inoculados em 225 folíolos de soja. Foi usado o delineamento inteiramente casualizado, com as unidades experimentais constituídas de um vaso com cinco plantas, e com cinco repetições.

## 2.1 Cultivo de Plantas

Plantas de soja, do cultivar suscetível CD 219 RR foram cultivadas em vasos plásticos, utilizando como substrato 2,0 Kg de solo hortado. A densidade de semeadura usada foi de 10 sementes por vaso, após a emergência das plântulas, foram deixadas apenas cinco plantas por vaso. Os vasos foram mantidos em casa-de-vegetação durante o desenvolvimento vegetativo das plantas. Quando atingiram o estágio vegetativo V4 - quarto nó, terceira folha trifoliolada aberta (apud Henning, et al, 2005) foram transferidas para câmara climatizada com temperatura e fotoperíodo controlado de 25°C e 12 horas de luz.

## 2.2 Produção do inóculo

O inóculo utilizado nesse trabalho foi obtido de isolados de folhas de soja, oriundas de Primavera do Leste no ano de 2003, preservados na micoteca do Laboratório de Fitopatologia – Micologia da UPF.

Com auxílio de agulha histológica flambada, foram transferidos fragmentos de colônias de *C. cassiicola* preservados em tubos de ensaio, para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (200 g de batata, 15 g

de sacarose e 12 g de ágar + 200 ppm de sulfato de estreptomicina), preparado segundo Fernandez (1993). Essas placas permaneceram em câmara de crescimento, a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  e com fotoperíodo de 12 horas durante 20 dias, até obter-se esporulação abundante.

### **2.3 Preparo da suspensão de inóculo**

A partir das culturas puras desenvolvidas nas placas, preparou-se uma suspensão de conídios em água esterilizada + polioxietilenosorbitano (Tween 20) duas gotas por litro. A densidade de inóculo foi determinada contando-se o número de conídios em 0,01mL, vertida numa lâmina e por varredura examinada ao microscópio. A partir da maior concentração ( $45 \times 10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup>), por diluições, obtiveram-se as concentrações de  $35 \times 10^3$ ,  $25 \times 10^3$ ,  $15 \times 10^3$  e  $5 \times 10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup>.

### **2.4 Inoculação das plantas**

A inoculação foi realizada pela aplicação das diferentes suspensões do inóculo com aspersor manual sobre os folíolos de soja, no estádio V4, até o ponto de escorrimento.

## **2.5 Incubação**

Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida propiciada por sacos plásticos, cobrindo as plantas de cada tratamento. Esse experimento permaneceu em câmara climatizada com temperatura constante de 25°C por 48 horas. Ao término deste período, as plantas foram transferidas para casa-de-vegetação onde permaneceram por sete dias até a avaliação.

## **2.6 Avaliações**

As avaliações foram realizadas sete dias após a inoculação. Quantificou-se a intensidade da mancha-alvo em folíolos de soja em relação as diferentes concentrações. Para isso, contou-se o número de lesão por folíolo e mediu-se o diâmetro das lesões (mm).

Os dados foram submetidos à análise de variância e de regressão.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Muitos autores tem demonstrado que diferentes intensidades da doença podem ser geradas com diferentes concentrações de inóculo, diferentes temperaturas, distintas durações do período contínuo de molhamento, pela reação diferenciada de cultivares e pela variação na

agressividade ou virulência do patógeno (May-De-Mio & Amorim, 2002; Hurtado & Toledo, 2003; Dalla Pria et al., 2003, Carisse et al, 2004; Telles Neto, 2004 e Cardoso, 2006).

Nesse trabalho, a intensidade da mancha alvo no cultivar de soja CD 219 RR aumentou com o incremento da concentração de conídios (Figura 1). Semelhante aos relatos de Telles Neto, 2004 e Cardoso, 2006, aumentos da densidade de inóculo determinam aumentos da intensidade de doença.

A menor concentração usada,  $5 \times 10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup> não diferiu estatisticamente da testemunha, a qual foi pulverizada apenas água. Nessa concentração, tanto o número quanto o diâmetro de lesões foram pequenos.

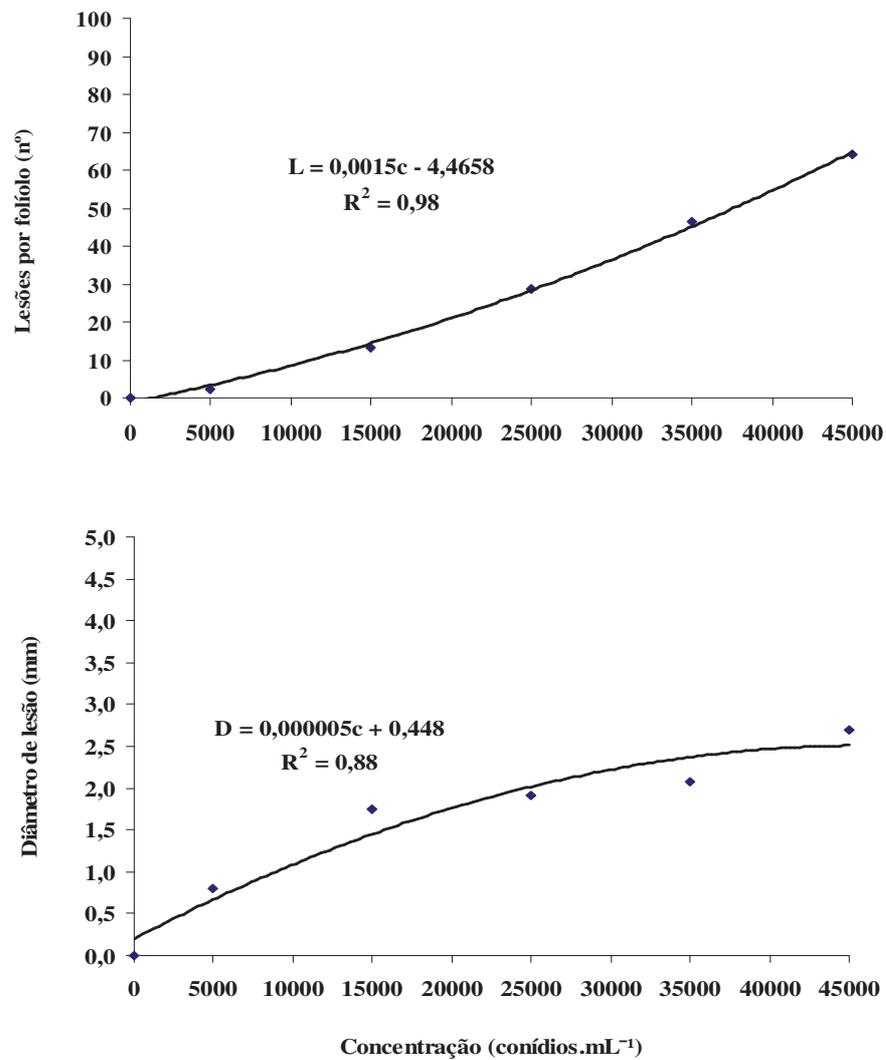


Figura 1– Efeito da concentração de inóculo (c) de *Corynespora cassicola* sobre o número (NL) e diâmetro (D) de lesões em folíolos de soja do cultivar CD 219 RR. Passo Fundo, RS. 2009.

A maior concentração usada,  $45 \times 10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup> resultou na maior intensidade de doença, diferindo estatisticamente das demais concentrações ( $35 \times 10^3$ ,  $25 \times 10^3$ ,  $15 \times 10^3$  e  $5 \times 10^3$ ), tanto no número quanto no diâmetro de lesões. Essa concentração de inóculo resultou em uma intensidade alta sobre os folíolos de soja, provocando grande coalescência das lesões e tornando muito difícil a avaliação. Por esse motivo, foi necessário avaliar o experimento aos sete dias após a incubação do patógeno. Esses resultados discordam dos obtidos por Almeida & Yamashita, (1978). Os autores testaram  $25 \times 10^3$ ,  $50 \times 10^3$  e  $100 \times 10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup> em folíolos de soja, e concluíram que concentração de  $50 \times 10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup> seria a melhor concentração para ser usada em trabalhos de melhoramento.

#### **4 CONCLUSÃO**

O aumento da densidade do inóculo proporciona incremento linear correspondente da intensidade de mancha alvo em folíolos de soja. Para avaliar a intensidade de doença, a concentração de  $35 \times 10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup> é suficiente, sendo grande o número e o diâmetro de lesões, porém, sem ocorrer o coalescimento das manchas, o que prejudica as avaliações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A. M. R., et al. Ocorrência de *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei no estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, vol. n°1, p. 111 -112. 1976.
- ALMEIDA, A. M. R. & YAMASHITA J. Crescimento e esporulação de *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei em diferentes meio de cultura. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, vol. n°1, p. 203 -206. 1976.
- ALMEIDA, A. M. R. & YAMASHITA J. Efeito da técnica de inoculação de *Corynespora cassiicola* na reação de três cultivares de soja. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, vol. 3, p.55 – 58, 1978.
- ALMEIDA, A. M. R., et al. Diferenciação de isolados de *Corynespora cassiicola*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, vol. 29, p. 316, 1994. Suplementos.
- ALMEIDA, A. M. R. et al. Doenças da soja. In: KIMATI, H. et al. (Eds.). *Manual de Fitopatologia*, vol. 2. Doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres, p.569-588, 2005.
- AGRIOS, G.N. *Plant Pathology*. San Diego, Academic Press, 1988. 803p.
- AZEVEDO, J.L. *A pesquisa agropecuária no Brasil*. Série Ciência & Tecnologia no Brasil, Escola de Administração de Empresas de São Paulo/FVG, 63p.,1993.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B.B. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Mineapolis, Minessotta, 3° edição, 1972.
- BORÉM, A. Escape gênico: os riscos do escape gênico da soja no Brasil. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 10: 101-107, 1999.

CARDOSO, A.A.C. Desenvolvimento de um sistema de aviso para brusone do trigo causada por *Pyricularia grisea*. 2006. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2006.

CARISSE, O.; BOURGEOIS, G. & DUTHIE, J. A. Influence of temperature and leaf wetness duration on infection of strawberry leaves by *Mycosphaerella fragariae*. *Phytopathology*. St. Paul, v.90, n.10, p.1120-1125, 2000.

CASSETARE NETO, D. et al. Avaliação de fungicidas no controle de ferrugem, antracnose e doenças de final de ciclo em soja em Sapezal MT. *Fitopatologia brasileira*, Lavras, vol. 31, p. S 269, 2006. Suplementos.

CONAB 2009 – Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2007/2008 – Décimo segundo levantamento – setembro de 2008. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/12\\_levantamento\\_s et2008.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/12_levantamento_s et2008.pdf)>. Safra de grãos. Acesso em: 17 outubro de 2008.

COSTAMILAN, L.M.; LHAMBY, J.C.B.; BONATO, E.R. Sobrevivência de fungos necrotróficos em restos de cultura de soja, em sistema de plantio direto. *Fitopatologia Brasileira*, v.22, p.175-177, 1999.

DALLA PRIA, M., AMORIM, L. & BERGAMIN FILHO, A. Quantificação dos componentes monocíclicos da mancha angular do feijoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.28, n.4, p.394-400, 2003.

DUARTE, M. L. R.; ALBUQUERQUE, F. C.; PRABHU, A.S. Uma nova enfermidade foliar no cacau (Theobroma cacao L.) causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt.) Wei. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.3, p. 259-265, 1978.

ELLIS, M.B. *Dematiaceous hyphomycetes*. Kew Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute/ CAB, 1971. 608p.

EMBRAPA. *Sistema de produção. Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil*. Versão eletrônica. Embrapa. 2003.

EMBRAPA. *Tecnologias de produção de soja – Paraná 2005*. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 224p.

EMBRAPA. *Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil – 2007*.- Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados : Embrapa Agropecuária Oeste, 2006. 225p.

FERNANDEZ, M. R. Manual para laboratório de fitopatologia. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1993.128. (EMBRAPA-CNPT. Documentos,6).

FERREIRA, F. A.; ALFENAS, A.C. Nova mancha de folha do ipê em viveiro causada por *Corynespora cassiicola*. *Árvore*, v.4, p. 103-110, 1980.

GASPAROTTO, L.; FERREIRA, F.A.; JUNQUEIRA, N.T.V. Mancha de *Corynespora* em folhas de Seringueira (*Hevea brasiliensis*) no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.13, n.3, p. 279-280, 1988.

GOMES, P. *A soja*. 5<sup>a</sup> edição, Editora Nobel, São Paulo, 1990, 152p.

HENNING et al. Manual de identificação de doenças da soja. Documentos 256. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 72p.

HURTADO, J. & TOLEDO, J. Efecto de la densidad de inoculo em la intensidad de la piricularia o brusone del trigo (*Pyricularia grisea*) *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 28, p.211.2003. Suplementos.

MAUDE, R. B. *Seedborne disease and their control*. Principles and practice. CAB International, Wallingford, 1996.

MAY-DE-MIO, L.L.; AMORIM, L. Influência da temperatura e da duração do molhamento foliar nos componentes monocíclicos da

ferrugem do álamo. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 28, n. 1, p. 33-39, 2002.

OLIVE, L. S.; BAIN, D. C.; LEFEBVRE, C. L. A leaf spot of cowpea and soybean caused by undescribed species of *Helminthosporium*. *Phytopathology*, St. Paul, v.35, p.822-831, 1945.

ONESIRAN, P.; ARNY, D.; DURBIN, R.D. Increasing sporulation of *Corynespora cassiicola*. *Mycopathologia*, Madison, Wisconsin, v.55, n 2, p. 121-123, 1975.

PHILLIPS, V.D. Fungal Leaf Spots IN: COLYER, P.D. *Soybean disease atlas*. 2º edição. Louisiana: Louisiana State University, 1989.

REIS, E. M. *Efeito da concentração de inóculo de Colletotrichum dematium f. truncata (Schw.) Von ARX na reação de variedades de soja (Glycine max (L.) Merr.* 1973. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1973.

REIS, E.M.; REIS, A.C.; FORCELINI, C.A. *Manual de fungicidas – guia para controle químico de doenças de plantas*. Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2007. 153p.

ROIM, F.L.B. *Morfologia e patologia de isolados de Corynespora cassiicola obtidos de mancha foliar (mancha-alvo) e podridão radicular da soja*. 2001. Dissertação (Mestrado em Agronomia Fitopatologia Jaboticabal) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2001.

SEAMAN, W. L., SHOEMAKER, R.A., PETERSON, E.A. Pathogenicity of *Corynespora cassiicola* on soybean. *Canadian Journal Botany*, Guelph, vol. 43, p. 1461 – 1469, 1965.

SNOW, J. P., BERGGREN JR, G. T. Target spot: In: Compendium of soybean diseases. 3. Ed. St Paul, Minnesota: *American Phytopathological Society*, p. 27-28, 1989.

SPENCER, J.A, WALTERS, H.J. Variations in certain isolates of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology*, Sant Paul, vol. 59, p. 5860, 1969.

TELLES NETO, F.X.B de. *Transmissão e controle de Fusarium graminearum em sementes e danos causados pela Giberela em trigo*. 2004. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2004.

TUITE, J. *Plant Pathological Methods – Fungi and Bacterial*. Department of Botany and Plant Pathology. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1969.

YORINORI, J.T. Levantamento e avaliação da situação de doenças da soja na safra 1987/88. In: *Resultados de Pesquisa de soja, 1987/88*. Londrina, EMBRAPA – CNPSo, 1989. p.158.

YORINORI, J.T. Epidemia de mancha-alvo (*Corynespora cassiicola*) na cultivar FT-Estrela na safra 1995/96. *XVIII Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil*. Uberlândia, 1996, p.319.

YORINORI, J.T. Controle integrado de doenças de soja. In: *Resultados de Pesquisa de soja, 1997*. Londrina, EMBRAPA – CNPSo, 1997. p.83.

ZADOKS, J. C.; SCHEIN, R. D. *Epidemiology and plant disease management*. New York: Oxford University Press, 1979. 427p.