

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

**“CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E
ENZIMÁTICA DE ISOLADOS DE *Corynespora*
cassiicola E REAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA À
MANCHA-ALVO”**

ANTÔNIO SÉRGIO FERREIRA FILHO

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, março de 2012

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

**“CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E
ENZIMÁTICA DE ISOLADOS DE *Corynespora*
cassiicola E REAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA À
MANCHA-ALVO”**

ANTÔNIO SÉRGIO FERREIRA FILHO

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, março de 2012



UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FITOPATOLOGIA



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.

“Caracterização morfológica e enzimática de isolados de *Corynespora cassicola* e reação de cultivares de soja a mancha-alvo”

Elaborada por

ANTÔNIO SÉRGIO FERREIRA FILHO

Como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Agronomia – Área de Fitopatologia

Aprovada em: 07/03/2012
Pela Comissão Examinadora


Dr. Erlei Melo Reis
Presidente da Comissão Examinadora
Orientador


Dra. Simone Meredith Scheffer Basso
Coord. Prog. Pós-Graduação em Agronomia


Dr. Ricardo Trezzi Casa
UDESC


Dr. Hélio Carlos Rocha
Diretor FAMV


Dr. Eduardo de Souza Lambert
Monsanto

CIP – Catalogação na Publicação

F383c Ferreira Filho, Antônio Sérgio

Caracterização morfológica e enzimática de isolados de *Corynespora cassiicola* e reação de cultivares de soja à mancha-alvo / Antônio Sérgio Ferreira Filho. – 2012.

84 f. : il., color. ; 25 cm.

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

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, 2012.

1. Soja - Doenças e pragas. 2. Soja – Sementes.
3. Fitopatologia. I. Reis, Erlei Melo, orientador. II. Título.

CDU: 633.34

Catalogação: Bibliotecária Schirlei T. da Silva Vaz - CRB 10/1364

SUMÁRIO

SUMÁRIO	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1.1 A cultura da soja	5
1.2 Mancha-alvo da soja	5
1.3 Ocorrência	6
1.4 Sinônimos	7
1.5 Danos	8
1.6 Etiologia	9
1.7 Ciclo das relações patógeno-hospedeiro	10
1.8 Sintomatologia	12
1.9 Fatores climáticos	15
2.0 Crescimento e esporulação	16
2.1 Concentração de inóculo	17
2.2 Método patométrico	18
2.3 Produção de enzimas	19
2.4 Controle	20
2.4.1 Cultivares resistentes	21
2.4.2 Tratamento de sementes	22

2.4.3	Rotação de culturas	22
2.4.4	Controle químico em órgãos aéreos.....	23
CAPÍTULO I.....		24
CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Corynespora cassiicola</i> DE SOJA.		24
RESUMO.....		24
ABSTRACT.....		26
1 INTRODUÇÃO.....		27
2 MATERIAL E MÉTODOS		30
2.1	Isolados	30
2.2	Isolamento monospórico.....	32
2.3	Mensuração dos conídios.....	33
2.4	Atividade enzimática	34
2.5	Limiares térmicos	36
2.6	Crescimento miceliano e esporulação	37
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO		40
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS		53
CAPÍTULO II		54
REAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA À MANCHA ALVO ...		54
RESUMO.....		54
1 INTRODUÇÃO.....		57
2 MATERIAL E MÉTODOS		59
2.1	Isolados	59
2.2	Plantas.....	60
2.3	Produção de inóculo	61
2.4	Métodos	62
2.5	Avaliações.....	64

2.6	Curvas de concentração	64
2.7	Reação de cultivares	65
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
	REFERÊNCIAS	78

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Características do conidióforo e conídio de <i>Corynespora cassicola</i> (RINZO & KITAZAWA, 1980).....	10
 CAPÍTULO I		
1	Identificação e procedência dos isolados de <i>Corynespora cassicola</i>	32
2	Comprimento (μm), largura (μm) e número de septos dos conídios dos isolados de <i>Corynespora cassicola</i> de soja.....	42
3	Índice de degradação enzimática dos isolados de <i>Corynespora cassicola</i>	44
4	Percentual e tipo de germinação dos conídios de <i>Corynespora cassicola</i> do isolado 25/MT em diferentes temperaturas.....	46
5	Classificação colorimétrica das colônias de isolados de <i>Corynespora cassicola</i> segundo a escala de Munsell (1975).....	51
6	Crescimento miceliano e esporulação dos isolados de <i>Corynespora cassicola</i> em diferentes substratos e regime de	52

luz.....

CAPÍTULO II

1	Identificação e procedência dos isolados de <i>Corynespora cassiicola</i>	60
2	Cultivares comerciais de soja utilizados no trabalho.....	62
3	Tamanho da lesão (mm) em função do método de inoculação com o isolado 25/MT no cultivar M8336RR.....	68
4	Reação de cultivares de soja a dois isolados de <i>Corynespora cassiicola</i>	75

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo da mancha-alvo da soja. Passo Fundo, RS. 2012.....	12
2	Sintomas da mancha-alvo da soja observados no campo.....	14
CAPÍTULO I		
1	Montagem de lâminas segundo a técnica de microcultura.....	34
2	Conídios de <i>Corynespora cassicola</i> do isolado 25/MT de soja.....	41
3	Contorno dos conídios de <i>Corynespora cassicola</i> , isolados de soja.....	42
4	Formato dos conídios de <i>Corynespora cassicola</i> , isolados de soja.....	43
5	Detecção de enzimas em meio sólido produzidas por <i>Corynespora cassicola</i>	44
6	Germinação de conídios de <i>Corynespora cassicola</i> isolado 25/MT em função da temperatura (°C).....	45
7	Regressão para germinação de conídios de <i>Corynespora cassicola</i> isolado 25/MT em função da	47

	temperatura (°C).....	
8	Morfologia de colônias de isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> sob influência de diferentes substratos e regime de luz.....	50
CAPÍTULO II		
1	Comparação dos métodos: a) M-1; M-2; c) M-3; e d) M-4.....	68
2	Imagem do folíolo central apresentando sintomas da mancha-alvo da soja.....	69
3	Imagem do folíolo central apresentando sintomas da mancha-alvo da soja. Tratamento da imagem para coleta dos dados.....	69
4	Análise das imagens pelo programa ASSESS 2.0 a) contagem das lesões; b) mensuração do diâmetro das lesões em mm.....	70
5	Comparação dos dados de tamanho de lesão (mm) obtidos pelo programa Assess 2.0 e paquímetro digital.....	70
6	Efeito da concentração de inóculo do isolado 25/MT sobre o número de lesões por folíolo central do cultivar M8336RR.....	72
7	Efeito da concentração de inóculo do isolado MES 307 sobre o número de lesões por folíolo central do cultivar	72

	BMX Potência RR.....	
8	Efeito da concentração de inóculo do isolado 25/MT sobre o diâmetro das lesões no folíolo central do cultivar M8336RR.....	73
9	Efeito da concentração de inóculo do isolado MES307 sobre o diâmetro das lesões no folíolo central do cultivar BMX PotênciaRR.....	73
10	Reação do cultivar Hutcheson inoculada com o isolado MES307. a) vista da unidade experimental; b) trifólio com detalhe da reação.....	75
11	Reação do cultivar BMX PotênciaRR inoculada com o isolado MES307. a) vista da unidade experimental; b) trifólio com detalhe da reação.....	76
12	Reação do cultivar TMG 113RR inoculada com o isolado MES307. a) vista da unidade experimental; b) trifólio com detalhe da reação.....	76

“Nada é particularmente difícil se o dividir em pequenas
tarefas”

Henry Ford

AGRADECIMENTOS

A Deus!

Presente em minha vida Você sempre está. Te agradeço pela sua maravilhosa e sincera amizade. Que esta perdure por muito e muito tempo. Obrigado por se fazer presente em minha história de vida e desfrutar comigo os bons momentos.

Obrigado!

À família!

Aos meus pais que muito contribuíram para a minha formação de Engenheiro Agrônomo

À minha esposa Renata Santin Ferreira que sempre esteve do meu lado me apoiando desde o dia em que a conheci.

Obrigado!

Ao professor Erlei Melo Reis!

Àquele que me ensinou o verdadeiro significado da palavra mestre. Pelo seu apoio, ensinamentos, amizade, humildade e orientação prestada.

Obrigado!

À Monsanto!

Pela concessão do tempo necessário para realizar o curso durante o trabalho

Obrigado!

Aos meus amigos!

Ricardo Brustolin, Anderson Danelli, Rosane Baldiga Tonin, Camila Turra, Camila Ranzi, Juliane Câmera, Roberto de Rossi, Aveline Avozani, Diana Erica Gomes, Andréia e Marília.

Claudiomir Abatti, Leonardo Oliveira, Rodrigo Marchiori, Gabriela Andrade, Marcos Norio Matsumoto, Mario Luis de Oliveira, Giovane Bonatto.

Pelas horas de descontração, apoio e auxílio na condução dos trabalhos.

Obrigado!

Aos funcionários da UPF!

Em especial para Cinara Cardoso e Paulo Tironi pelo apoio, companheirismo, aprendizado, horas de descontração e paciência.

À Mari Vicelli pela colaboração e paciência

Obrigado!

Aos professores e banca!

Ricardo Trezzi Casa, Eduardo de Souza Lambert, Carlos A. Forcelini, Norimar Denardin

Obrigado!

A todos!

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução dos experimentos.

Obrigado!

**“CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ENZIMÁTICA DE
ISOLADOS DE *Corynespora cassiicola* E REAÇÃO DE
CULTIVARES DE SOJA À MANCHA-ALVO”**

ANTÔNIO SÉRGIO FERREIRA FILHO¹

RESUMO - O Brasil figura como o segundo maior produtor mundial de soja. Dentre os principais fatores limitantes da produção, destacam-se a ocorrência de doenças na cultura da soja, merecendo destaque a mancha-alvo causada pelo fungo *Corynespora cassiicola*. Os danos causados pela mancha alvo podem chegar a 45% . Tendo em vista a importância desta doença, foi realizado este trabalho para caracterizar isolados de diferentes regiões sojícolas do Brasil e conhecer a reação de alguns cultivares de soja com a metodologia proposta. Foi encontrado variabilidade no contorno, formato dos conídios dos isolados, bem como nos índices de degradação enzimática que variaram de 1,09 a 2,74. Os limiares térmicos inferior e superior foram, respectivamente, de 0 e 40,4° C e a temperatura ótima de 20,2° C. Para se estudar o crescimento miceliano, esporulação e avaliação colorimétrica das colônias dos isolados, foram utilizadas placas de Petri com sete substratos – Batata Dextrose Ágar (BDA), Solução Czapek Ágar (CZP), Alimento infantil (AI), Caldo de Hortalças (CH), Cenoura Ágar (CA) e Extrato de soja (ES) e dois regimes de luz. A coloração das colônias foi avaliada com a utilização da carta de cores de Munsell e variaram de de oliva-cinza-escuro (5Y3/2) a cinza claro (5Y7/1). O crescimento miceliano foi avaliado através de paquímetro digital e expresso em mm. A esporulação foi estimada como número de esporos por cm² de cada substrato e regime de luz. O maior crescimento miceliano e esporulação do fungo foram obtidos

nos substratos Extrato de Soja com folhas, hastes e vagens de material suscetível (ES-S) e alimento infantil (AI) sob fotoperíodo de 12 horas de luz. Para o estudo da reação de cultivares, foram comparadas quatro metodologias de inoculação: M-1) inoculação no campo; M-2) inoculação com período pós inoculação de 48 horas em câmara úmida; M-3) inoculação com período pós inoculação de 48 horas em câmara úmida associada com molhamento foliar noturno mantido, simulando as condições de orvalho à campo; M-4) folha destacada. Os métodos 3 e 4 apresentaram diâmetro de lesões com tamanho variando de 2 a 14,3 (mm) similares aos tamanhos obtidos no campo. Foi construída uma curva de resposta para o número de lesões no folíolo central e diâmetro das lesões (mm) em função de diferentes concentrações de conídios ou micélio triturado / mL de suspensão. As concentrações de 45×10^3 conídios/mL e 50×10^3 de micélio triturado/mL apresentaram número de lesões e tamanho de lesão satisfatórios não ocorrendo coalescência das lesões. Na reação de cultivares, foram utilizados BMX PotênciaRR, Hutcheson, M8336RR, M8360RR, M-Soy 8001, NK 7059RR (V-maxRR), TMG 113RR e dois isolados (IS-01/MG e MES307), Foram avaliados a desfolha (%), a incidência (%), o número de lesões e o tamanho da lesão (mm). Os cultivares resistentes foram NK7059RR e Hutcheson e os mais suscetíveis M-Soy 8001 e TMG113RR. Não foi encontrado nenhum cultivar imune à mancha-alvo.

Palavras-chave: Método, concentração, suscetibilidade, temperatura.

¹ Engenheiro Agrônomo, mestrando do programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração em Fitopatologia.
antonio.sergio@monsanto.com

“MORPHOLOGICAL AND ENZYMATIC CHARACTERIZATION
OF *Corynespora cassiicola* ISOLATES AND REACTION OF
SOYBEAN CULTIVARS TO TARGET LEAF SPOT”

ABSTRACT - Brazil appears as second producer of soybeans. Among the main factors limiting the production, we highlight the occurrence of soybeans diseases specially target spot caused by the fungus *Corynespora cassiicola*. The damage caused by the target spot can be reach 45%. Given the importance of this disease, this work was performed to characterize isolates from different regions of Brazil and know the reaction of some soybean cultivars with use of proposed methodology. It was found variability in the contour and shape of the spore isolates, as well as the enzyme degradation rates ranging from 1,1 to 2,7. The upper and lower threshold temperatures were respectively 40,4 and 0 °C and the optimum temperature calculated was 20,2 °C. To study the mycelial growth, sporulation and colonies colorimetric evaluation of isolates were used Petri dishes with seven different substrates - Potato Dextrose Agar (PDA), Czapek Solution Agar (CZP), Infant Food (AI), Vegetable Broth (CH), carrot agar (CA) and Soy Extract (ES) and two light conditions. The color of colonies was assessed using the Munsell color chart and resuted a ranging from olive-dark gray (5Y3 / 2) to gray (5Y7 / 1). The mycelial growth was evaluated using a digital caliper and expressed in mm. Sporulation was estimated as number of spores per cm² of each substrate and the light condition. The greatest growth and sporulation were obtained on substrates with Soy Extract performed with leaves, steams and pods of susceptible material (S-ES) and baby food (AI) under a photoperiod of 12 hours of light. To study the reaction of

cultivars, we compared four inoculation techniques: M-1) inoculation on field; M-2) inoculation with 48 hours in a moist chamber post inoculation; M-3) inoculation with 48 hours in a moist chamber post inoculation associated with leaf wetness kept for overnight, simulating field conditions; M-4) detached leaves. Methods 3 and 4 had lesions with diameter sizes ranging from 2 to 14.3 (mm), similar to those obtained in the field. It was built a response curve for number of lesions in the central leaflet and lesion diameter (mm) for different conidia concentrations or mycelium macerated / mL. The conidia and mycelium macerated concentration/ mL of 45×10^3 and 50×10^3 respectively showed a number of lesions, and lesion size satisfactory not occurring coalescence of lesions. For the reaction of cultivars were used BMX PotênciaRR, Hutcheson, M8336RR, M8360RR, M-Soy 8001, NK 7059RR (V-maxRR), TMG 113RR and two isolates (IS-01/MG and MES307). Were evaluated defoliation (%), incidence (%), number of lesions and lesion size (mm). The resistant cultivars were Hutcheson and NK7059RR and more susceptible were M-Soy 8001 and TMG113RR. Not found immune cultivar to target leaf spot.

Keywords: Method, concentration, susceptible, temperature.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 A cultura da soja

O Brasil ocupa posição de destaque na produção mundial de grãos. Dentre as plantas cultivadas que contribuem para esta posição no cenário mundial, a soja pode ser destacada como umas das principais culturas. Foram estimados para a safra 2011/12, 68,7 milhões de toneladas desta oleaginosa (CONAB, 2012)

Com esta produção, o Brasil figura como o segundo maior produtor mundial desta oleaginosa, situando-se atrás apenas dos Estados Unidos da América (EUA), o maior produtor mundial. Dentre os estados brasileiros com maior produção desta oleaginosa, destacam-se nesta ordem: Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul (CONAB, 2012).

A produtividade média brasileira da cultura é estimada em 2.753 Kg / ha. (CONAB, 2012). Muitos fatores contribuem para que a produtividade da soja seja limitada em algumas regiões e safras, podendo ser destacado a ocorrência de doenças.

1.2 Mancha-alvo da soja

Ocorrem cerca de 47 doenças na cultura da soja (YORINIRI, 1997). De acordo com Silva et. al. (2002), a incidência destas doenças na cultura da soja levaram a danos de 6,2 milhões de toneladas e perdas estimadas em 1,3 bilhões de dólares. Dentre as doenças de importância na produção da cultura, pode-se destacar a

mancha-alvo causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* Berk. & M. A. Curtis (WEI, 1950). No ano de 1994, os danos e perdas causados pela mancha alvo na soja não eram significativos, porém na safra 2000 já se contabilizava danos no Brasil de 120 mil toneladas e perdas de 26,4 milhões de dólares (SILVA et. al., 2002).

Esta doença esta se tornando cada vez mais importante devido à sua ocorrência em caráter epidêmico nas regiões que compreendem desde o sul do Brasil, podendo ser destacado o estado do Paraná, até a região centro-oeste.

1.3 Ocorrência

O fungo *C. cassiicola* já foi relatado causado doenças em mais de 70 espécies de plantas hospedeiras distribuídas em diversos países de clima tropical e subtropical (SILVA et al., 1995). O fungo pode infectar espécies de plantas importantes economicamente, destacando-se: a mandioca (*Manihot* sp.), mamona (*Ricinis communis*), algodão (*Gossypium hirsutum*), feijão de corda (*Vigna unguiculata*), pepino (*Cucumis sativus*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), quiabo (*Hibiscus esculentus*), mamão (*Carica papaya*), pimenta (*Capsicum frutescens*), seringueira (*Hevea brasiliensis*), gergelim (*Sesamun indicum*), tomate (*Lycopersicum esculentum*), melância (*Citrullus vulgaris*), soja (*Glycine max*) (SNOW & BERGGREN, 1989; MALVICK, 2004). Em razão desta ampla gama de hospedeiros e distribuição geográfica extensa, Ellis (1971) considera o fungo *C. cassiicola* como uma espécie cosmopolita e inespecífica.

A mancha-alvo foi encontrada pela primeira vez nos EUA causando danos à cultura da soja em 1945 (OLIVE et al., 1945).

No Brasil, Almeida et al. (1976) relataram pela primeira vez a ocorrência de *C. cassicola* no estado de São Paulo. De acordo com Yoriniri & Homechin (1977), Kiihl informou pessoalmente aos autores, que o fungo *C. cassicola* foi observado pela primeira vez no estado do Mato Grosso. Posteriormente, foi encontrado no estado do Rio Grande do Sul por Veiga (1978), em áreas de experimentos do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Rurais da Universidade de Santa Maria. Yorinori (1988), relatou a ocorrência do fungo no município de Castro, estado do Paraná, na safra 1986/87, causando podridão radicular e manchas foliares. Na safra 1987/88, a mancha-alvo foi constatada nos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul (YORINORI, 1989). Atualmente esta doença é encontrada em todo o Brasil causando danos à cultura da soja.

1.4 Sinônimos

O fungo causador da mancha-alvo em diversas espécies de plantas é denominado atualmente de *Corynespora cassicola* BERK. & CURTIS (WEI, 1950), porém encontra-se na literatura alguns sinônimos como: *Helminthosporium cassicola* (BERKELEY, 1869), *Cercospora melonis* (COOKE, 1896), *Corynespora mizei* (GUSSOW, 1906), *Cercospora vignicola* (KAWAMURA, 1931) e *Helminthosporium vignae* (OLIVE, et al. 1945)

1.5 Danos

A mancha-alvo é encontrada em diferentes incidências e severidades nas áreas produtoras de soja do Brasil. O fungo *C. cassiicola* pode atacar as raízes, hastes, as vagens, e principalmente, as folhas das plantas, onde causa a redução da área fotossintética em função das lesões foliares, e posterior desfolha de forma precoce, ou seja, há a abscisão trifoliolar nas plantas de soja, antes que completem seu ciclo de vida (ALMEIDA et al., 2005; CARREGAL et al., 2008).

Hartwig (1959), relatou que num período de cinco anos de estudo no delta do Mississippi nos EUA, os danos causados pela mancha-alvo variaram de 18 a 32%. Posteriormente, o autor relatou que a doença não se desenvolveu o suficiente para causar desfolha devido a menor precipitação pluvial, quando comparado com os primeiros cinco anos. Na safra 2004, nos EUA, foram estimados danos de 20 a 40% (KOENNING & CRESWELL, 2006).

No Brasil, na safra 1995/96 foi verificada a ocorrência desta doença de forma generalizada no estado do Paraná causando desfolha pré-matura e danos estimados entre 40 a 45% (YORINORI, 1996).

Trabalhos conduzidos pela Universidade de Rio Verde (FESURV), no estado do Tocantins, demonstram que os danos podem variar de 10 a 20% (CARREGAL et al., 2008).

1.6 Etiologia

O fungo *Corynespora cassiicola* pertence à classe dos *Deuteromycetes*, subclasse *Hyphomycetidae*, família *Dematiaceae*, gênero *Corynespora* e espécie *C. cassiicola* (BARNET & HUNTER, 1972).

O micélio é imerso e não apresenta estroma. Em meio de cultura é branco e floculento, tornando-se mais tarde cinza escuro e constituído de um emaranhado preto oliváceo (SNOW & BERGGREN, 1989 e ELLIS, 1971). O gênero *Corynespora* foi descrito de forma detalhada por Wei (1950). Posteriormente, Ellis (1957) criou uma chave de identificação para algumas espécies do gênero *Corynespora* baseada em características específicas. Dentre os patógenos do gênero *Corynespora* foram descritos 25 espécies por Ellis (1971)

De acordo com Snow & Berggren (1989) e Ellis (1971), o patógeno apresenta conidióforos eretos, ramificados, de coloração pálida a marrom, medindo de 110-850 μm de comprimento por 4-11 μm de largura. Os conídios podem ser encontrados de forma isolada ou em cadeia de dois a seis, de coloração marrom oliváceo, dilatados na base, retos ou ligeiramente curvados, com 4 a 20 pseudoseptos, medindo de 40-420 μm de comprimento, sendo que em meio de cultura pode chegar a 520 μm x 9-22 μm de espessura. Rinzo & Kitazawa (1980), sumarizaram as características do conidióforo e do conídio de *C. cassiicola* conforme a descrição realizada por diversos autores (Tabela 1).

Tabela 1 - Características do conidióforo e conídio de *Corynespora cassicola* (RINZO & KITAZAWA, 1980).

	Descrição	Ellis (1971)	Seaman et. al. (1965)	Rinzo & Kitazawa (1980)
Conidióforo	Forma	ereto, simples	ereto	ereto, plano
	Cor	pálida a marrom	hialino a marrom	marrom
	Tamanho (μm)	110-850 x 4-11	75-165 x 6-8	25-135 x 6-9
	Septo	1-9	1-8	1-7
Conídio	Forma	obclavado, cilíndrico	obclavado, cilíndrico	obclavado, cilíndrico
	Cor	marrom oliváceo	marrom hialino	marrom hialino
	Tamanho (μm)	40-220 x 9-22	103-343 x 12-25	40-360 x 8-23
	Septo	4-20	2-24	2-28
	Formação de conídios	em cadeia	em cadeia	em cadeia
	Hilo (μm)	4-8	4-8	4-8

1.7 Ciclo das relações patógeno-hospedeiro

É um patógeno necrotrófico, ou seja, nutre-se de tecidos mortos ou, em decomposição do hospedeiro, e sobrevive nas sementes ou no resto cultural em decomposição, pertencendo ao grupo Va de McNew (ALMEIDA et. al., 2005)

A partir do uso de sementes infectadas, ocorre a transmissão, originando lesões primárias nos cotilédones e no hipocótilo das plântulas. Nestas lesões ocorrem pela primeira vez na safra a formação dos conídios concluindo o ciclo primário da doença.

Os conídios (esporos secos) são disseminados pelo vento podendo infectar novas plantas, novas lavouras, por meio dos ciclos secundários da doença que vão caracterizar o caráter epidêmico da doença (ALMEIDA et al., 2005). Quando os tecidos do hospedeiro estiverem se esgotando, o fungo atinge finalmente as vagens e voltará às sementes ou ficará se nutrindo dos restos culturais do hospedeiro no solo, até que novo cultivo de soja seja re-estabelecido (ALMEIDA et al., 2005).

Utilizando-se de um método indireto de avaliação da sobrevivência em solo, pelo plantio periódico do hospedeiro neste local, após um período de doze meses sem o hospedeiro sendo cultivado, ainda houve uma incidência de 50% da doença em plantas de soja, concluindo-se que o patógeno sobrevive nos restos culturais em decomposição (RINZO & KITAZAWA, 1980).

O patógeno pode permanecer em restos culturais de um grande número de espécies vegetais no solo, colonizando os mesmos, saprofiticamente (SNOW & BERGGREN, 1989).

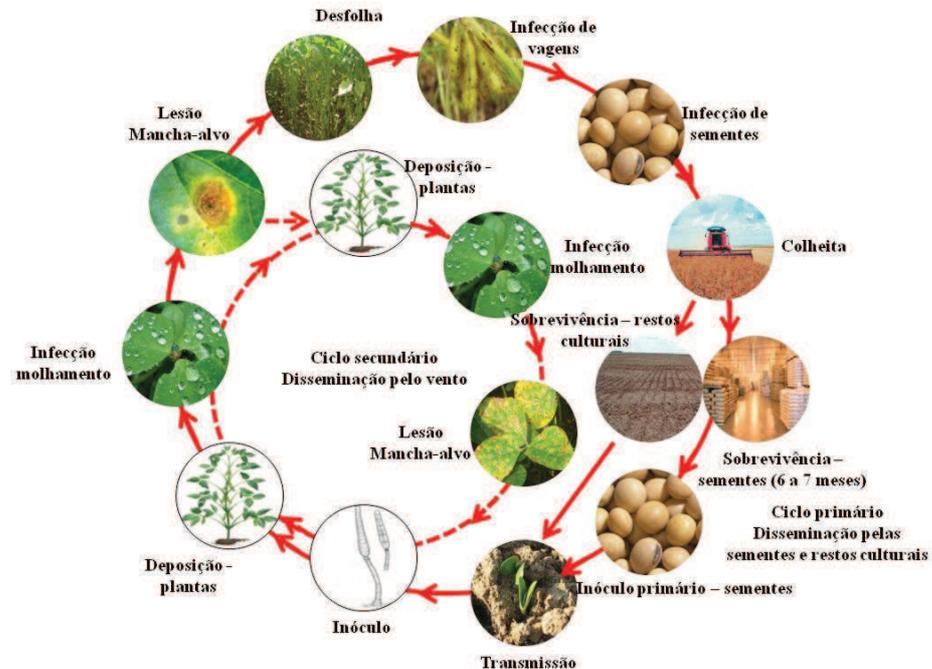


Figura 1- Ciclo da mancha-alvo da soja. Passo Fundo, RS. 2012

1.8 Sintomatologia

Os sintomas nas folhas inicialmente se caracterizam por pequenos pontos de coloração castanho avermelhada a parda. Com a evolução da doença este pontos evoluem para manchas de formato arredondado, ou irregular, da mesma coloração variando em tamanho de 10 a 15 mm. Muitas vezes, as lesões quando completamente desenvolvidas, apresentam anéis concêntricos de tecidos mortos circundados por um halo de coloração verde amarelado muito similar a um alvo, por isso o nome comum da doença de mancha-alvo. Nas

vagens, pecíolos e hastes as lesões são irregulares de coloração castanha avermelhada e levemente deprimidas. Ainda nas vagens, com a evolução da doença pode ocorrer a sua abertura (ALMEIDA et al., 2005; HARTMAN et al., 1999). Dentre os principais problemas encontrados na literatura, está a comparação dos sintomas obtidos em inoculações artificiais com a descrição dos sintomas obtidos no campo, principalmente, no que diz respeito ao tamanho da lesão.

Spencer & Walters (1969), obtiveram lesões com tamanho ao redor de 3 milímetros em inoculações artificiais em soja. Em seu trabalho de estudo de especificidade de *C. cassicola* quanto ao hospedeiro, Onesirosan et al. (1974), obtiveram lesões de 2 milímetros utilizando isolados de outras espécies vegetais em soja. Quando os autores utilizaram isolados provenientes de soja, comentaram que os mesmos foram altamente virulentos e que as lesões formaram grandes áreas, porém não apresentaram as medidas das lesões.

Roim (2001), classificou as lesões em pequena (menor que 2 mm), média (2,1 a 7 mm), grande (maior que 7,1 mm), porém em suas avaliações não foi apresentada a mensuração das lesões em milímetros para cada cultivar. Muliterno de Melo (2009) obteve em inoculação artificial lesões que variaram de 1,6 a 2,7 milímetros em diferentes cultivares de soja.

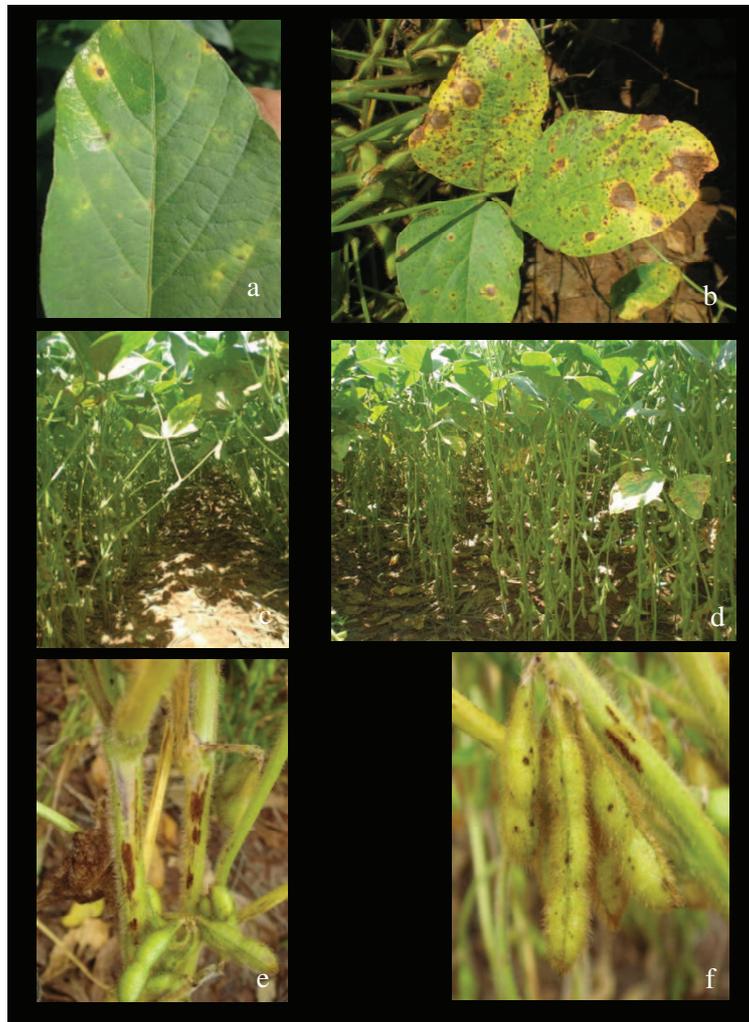


Figura 2 - Sintomas da mancha-alvo da soja observados no campo.

1.9 Fatores climáticos

De acordo com Muliterno de Melo (2009), a temperatura ótima para a germinação de conídios de *C. cassiicola* foi de 23°C. Ainda foi destacado pela autora que o limiar térmico inferior, a temperatura mínima para que ocorra a germinação de um conídio, foi de 7 °C e o limiar térmico superior foi de 39 °C. Seaman & Shoemaker (1965), demonstraram que em meio água-ágar a maior germinação de conídios ocorreu na temperatura de 20°C. O mesmo autor ainda demonstrou o tipo de germinação por temperatura, sendo que neste mesmo substrato e temperatura, a de maior frequência foi a basal, onde o tubo germinativo ou pró-micélio forma-se a partir da base do conídio, na região próxima ao hilo do conídio.

Quanto à umidade relativa, de acordo com Snow & Berggren (1989) e Fundacruz (2006), umidade relativa do ar igual ou superior a 80% favorece a doença, sendo que o déficit hídrico inibe o crescimento do fungo. Precipitações pluviais acima de 800 mm no ciclo da cultura da soja, resultam num aumento da severidade da doença (FUNDACRUZ, 2006). May de Mio & Amorim (2002), destacaram que além da temperatura, outros fatores como a duração do molhamento foliar contínuo são de importância para o desenvolvimento de epidêmias.

Almeida e Yamashita (1978), realizando inoculação de *C. cassiicola* em plantas de soja, verificaram que a incubação das plantas pós inoculação por período 48 horas em câmara úmida, promoveu a melhor infecção quando comparado com incubações de 12 e 24 horas. Spencer & Walters (1969), obtiveram intensidade adequadas para

soja, com incubação por um período de 45 horas. Onesirosan et al. (1974), utilizaram o período de incubação de 48 horas em testes de patogenicidade com soja.

2.0 Crescimento miceliano e esporulação

O crescimento miceliano de isolados de *C. cassicola* têm se mostrado lento em meio de cultura de BDA (Batata Dextrose Ágar) segundo Almeida & Yamashita (1976). Estes mesmos autores demonstraram que este fungo apresentou melhor crescimento miceliano nos meios V-8, Alimento Infantil e Extrato de Soja, quando comparado com BDA, Malte-ágar e Czapeck-ágar. Quanto à esporulação, as maiores, foram obtidas em meio V-8 e Alimento Infantil. Olive et al. (1945) obtiveram esporulações em meio BDA e Czapeck-ágar.

Roim (2001), obteve para isolados provenientes de folhas, maior crescimento miceliano em meio BDA e BDA 500 (meio BDA suplementado com 500 gramas de batata). Segundo esta autora, as melhores esporulações destes isolados foram obtidas em meio BDA com fotoperíodo de doze horas. Também foi feita uma classificação dos isolados quanto à coloração de suas colônias em meio BDA, utilizando um método subjetivo na avaliação.

Muliterno de Melo (2009), obteve melhor esporulação em meio Czapeck-ágar com papel de filtro e fotoperíodo de doze horas de luz. Almeida & Yamashita (1977), demonstraram também a influência do pH sobre o crescimento e esporulação deste fungo. Os melhores

resultados de crescimento e esporulação obtidos por este autor foi na faixa de pH entre 6,5 a 7,5.

Tendo em vista a influência de fatores como substrato, pH, luz e isolados no crescimento e esporulação de *C. cassiicola*, torna-se importante determinar o substrato e a luminosidade ideais para o crescimento e esporulação de isolados coletados aleatoriamente em regiões distintas, para que se faça inferências à espécie *C. cassiicola*.

Quanto à coloração das colônias, torna-se importante a utilização de uma escala colorimétrica objetiva como a descrita por Munsell (1975), onde este autor classificou numericamente as cores com base em uma carta de cor para comparação durante a avaliação visual das colônias eliminando assim a subjetividade nas avaliações.

2.1 Concentração de inóculo

Almeida & Yamashita (1978), estudaram o efeito da concentração de inóculo na reprodução de sintomas da doença mancha-alvo sobre cultivares de soja. Estes autores utilizando as concentrações de 25×10^3 , 50×10^3 e 100×10^3 conídios/mL de suspensão, concluíram que a concentração de 50×10^3 conídios/mL foi a que melhor resultado apresentou, sendo que na concentração de 100×10^3 conídios/mL houve coalescência das lesões, o que dificultou as avaliações.

Roim (2001), utilizou em seu trabalho micélio triturado em liquidificador não havendo um estudo da relação entre o número de estruturas infectivas na reprodução dos sintomas. Muliterno de

Melo (2009), estudou o efeito da concentração de conídios/mL sobre o número de lesões por folíolo central e também sobre o diâmetro das lesões. A autora utilizou as concentrações de 0, 5×10^3 , 15×10^3 , 25×10^3 , 35×10^3 e 45×10^3 conídios/mL. No trabalho concluiu que a concentração de 35×10^3 conídios/mL foi suficiente para avaliar diferentes cultivares de soja, pois não ocorreu o coalescimento das manchas foliares.

Os trabalhos citados na literatura demonstram o efeito da concentração na reprodução dos sintomas da doença, porém é de importância encontrar uma relação matemática que explique esta relação de forma que seja elucidado a variância nos dados promovidos por cada concentração, pois pelos dados de literatura, maiores concentrações de inóculo proporcionam a coalescência de lesões e portanto devem apresentar maior variação nos dados, o que para um programa de melhoramento visando estudar genótipos quanto a sua resistência genética não é interessante.

2.2 Método patométrico

A escolha do método patométrico adequado é importante para se obter resultados adequados à realidade de cada doença (REIS et al. 2009). Reis et al. (2004), determinaram que o oídio da soja pode ser avaliado através da incidência trifoliolar e sua severidade através de uma escala diagramática. Soares et al. (2009), desenvolveram uma escala diagramática para a avaliação da severidade da mancha alvo da soja. Roim (2001), avaliou a severidade da mancha-alvo da soja visualmente com o auxílio de uma escala de notas.

Reis et al. (2009), determinaram que para doenças foliares do trigo, uma folha deverá ser considerada doente quando apresentar no mínimo uma lesão maior do que dois milímetros.

Muliterno de Melo (2009), tomou como base para as suas avaliações da reação de cultivares à mancha-alvo da soja, o folíolo central. A autora, determinou o número de lesões e o diâmetro da lesão em milímetros para comparar a reação de diferentes cultivares de soja.

2.3 Produção de enzimas

Agrios (2005), apresentou um modelo adaptado de Goodman et al. (1967), da estrutura epidermal das células de tecidos foliares. Neste modelo o autor apresentou o aparato que representa uma barreira física à ação dos patógenos. Agrios (2005), relacionou cada mecanismo de ação de diferentes enzimas na patogenicidade dos fitopatógenos. Segundo o autor, embora alguns patógenos utilizem a força mecânica para penetrar os tecidos da planta, a atividade dos fitopatógenos em plantas são de natureza química condicionada principalmente a produção de enzimas e toxinas. A parede da célula vegetal é composta basicamente de quatro polissacarídeos maiores como celulose, hemicelulose, lignina e pectina (NITURE & PANT, 2007). Muitos fungos saprofíticos, fitopatogênicos ou não, secretam enzimas durante a fase de crescimento saprofítico ou durante o processo de patogênese às plantas (THORMANN et al. 2000). De acordo com Niture & Pant (2007), a celulose pode ser hidrolisada por

várias enzimas como por exemplo a 1, 4- β -D-glucanase, exo-1,4- β -glucanase e a β -D-glucosidase. De acordo com este mesmo autor a pectina pode ser degradada por uma combinação de enzimas como a pectina-metil-esterase e pectina despolimerase incluindo hidrolases e liases. As pectinas depolimerases como a poligalacturonase e a pectato liase agem sobre as regiões homo-galacturônicas da pectina por mecanismos de clivagem hidrolíticos e trans-eliminação. Agrios (2005) descreveu o funcionamento de outras enzimas também nos mecanismos de ação dos patógenos. Hankin & Anagnostakis (1975) e Paterson & Bridge (1994) descreveram várias metodologias para a detecção da produção de enzimas específicas em meio sólido por fungos. Annakutty (1998) demonstrou em seu trabalho com *C. cassicola* patogênica à seringueira, que este fitopatógeno pode produzir várias enzimas envolvidas no mecanismo de patogênese ao hospedeiro. Este mesmo autor mostrou que este fungo pode produzir também, uma toxina específica ao hospedeiro denominada de cassicolina. Portanto torna-se necessário estudar a produção de enzimas para os isolados de *Corynespora* provenientes de tecido foliar de soja visando entender os mecanismos de patogenicidade destes sobre soja.

2.4 Controle

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

2.4.1 Cultivares resistentes

Walker citado por Van der Plank (1968), descreveu que o programa de desenvolvimento ou melhoramento de cultivares resistentes a doenças deve ser um processo contínuo, pois a variabilidade potencial dos fitopatógenos não permite que uma variedade seja resistente por um período indefinido. Agrios (2005), descreveu que as plantas podem ser imunes aos patógenos quando as mesmas não são hospedeiras. O autor descreveu também que a resistência pode ser qualitativa ou oligogênica e também quantitativa ou poligênica. Na resistência qualitativa não ocorre a doença no hospedeiro resistente, enquanto que na resistência quantitativa tem-se a doença em diferentes intensidades dentro do hospedeiro, sendo que nesta última a planta sobrevive e há produção. Van der Plank (1968), demonstrou que na análise de variância dos dados provenientes de avaliações de doenças, pode se obter a interação entre cultivares e isolados ou cultivares e raças de um fitopatógeno. Este autor também descreveu de forma detalhada o fator de agressividade e virulência de um fitopatógeno. A virulência muitas vezes, segundo Van der Plank, parece ser herdada oligogenicamente e a agressividade poligenicamente.

Spencer & Walters (1969), Onesirosan et al. (1974) e Oliveira et al. (2007), estudaram a especificidade de isolados de *C. cassiicola* quanto ao seu hospedeiro demonstrando que isolados de diferentes espécies podem ser patogênicos a outras espécies, mas não obrigatoriamente. Roim (2001) e Muliterno de Melo (2009),

estudaram a reação de diferentes cultivares de soja a um isolado de *C. cassiicola* demonstrando haver diferenças na reação dos cultivares.

O objetivo deste trabalho foi estudar a reação de cultivares comerciais de soja à isolados de diferentes regiões visando entender a reação do hospedeiro frente à agressividade e virulência dos isolados.

2.4.2 Tratamento de sementes

Para o tratamento de sementes de soja, visando o controle de *C. cassiicola*, recomenda-se a associação de carbendazim (150 g/L) + tiram (350 g/L) SC 200mL/ 100Kg de sementes (REIS et al., 2010). Avozani (2011) relatou a perda da sensibilidade de isolados de *C. cassiicola* ao ingrediente ativo carbendazim, portanto não deve-se utilizar este princípio isoladamente.

2.4.3 Rotação de culturas

A monocultura ou mesmo os sistemas de sucessão trigo-soja ou milho safrinha-soja, tende a provocar a degradação física, química e biológica do solo e a redução da produtividade das culturas. Além disso, a permanência do substrato preferencial do fungo no sistema de produção proporciona condições mais favoráveis para o desenvolvimento de doenças com a permanência dos fungos necrotróficos na área (COSTAMILAN et al., 1999). Nas regiões dos Cerrados predomina a monocultura de soja (EMBRAPA, 2003). Almeida et al. (2005), recomenda a rotação de culturas como milho e outras espécies de gramíneas para o controle da mancha-alvo.

2.4.4 Controle químico em órgãos aéreos

Os fungicidas descritos para o complexo de doenças de final de ciclo (DFC) são os mesmos recomendados para o controle da mancha-alvo na parte aérea da cultura da soja, sendo: azoxistrobina, azoxistrobina + ciproconazol, carbendazim, difenoconazol, flutriafol, piraclostrobina + epoxiconazol, tebuconazol, tiofanato metílico, tiofanato metílico + flutriafol, trifloxistrobina + ciproconazol, trifloxistrobina + propiconazol (EMBRAPA, 2007).

Cassetare Neto et al. (2006), avaliaram o efeito de diferentes fungicidas e doses no controle da ferrugem, antracnose e mancha-alvo em soja, e encontraram que a mistura tebuconazol + carbendazim (100 + 125 mL.ha-1) apresentou melhor controle da mancha-alvo, sendo obtida a maior produtividade das parcelas experimentais e menor percentual de desfolha da cultura.

Avalhaes et al. (2010) relatam que os melhores resultados no controle da mancha-alvo através de experimentos realizados no município de Campo Verde (MT), foram com a aplicação de tebuconazol + azoxistrobina associados ou não ao carbendazim, nas épocas de pré floração, início da formação de vagens, início de enchimento de grãos e 50 a 75% de granação

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Corynespora cassicola* DE SOJA.

ANTÔNIO SÉRGIO FERREIRA FILHO¹

RESUMO – O fungo *Corynespora cassicola* foi relatado causando doenças em mais de 70 espécies incluindo a soja. Realizou-se uma caracterização de isolados de diferentes regiões sojícolas do Brasil quanto à medida, forma, contorno de seus conídios, atividade enzimática, temperatura para germinação dos conídios, crescimento, esporulação e coloração das colônias. Através de lâminas de microcultura, 100 conídios dos diferentes isolados foram mensurados, sendo encontrados 5 a 15 septos, 20 a 300 μm de comprimento 7 a 15 μm de largura. Houve grande variabilidade no contorno classificado como reto e curvo. Para o formato, foram encontrados conídios ovais, cilíndricos e obclavados. Para a determinação da atividade enzimática dos isolados em meio sólido, utilizou-se seis diferentes substratos com posterior cálculo do índice de degradação. Os isolados apresentaram grande variabilidade nos índices de degradação enzimática que variaram de 1,09 a 2,74. Também foram determinados os limiares térmicos e a temperatura ótima para a germinação dos conídios através de incubação de placas contendo água-ágar a 1% e suspensões de 300 μL de conídios, por oito horas, sob temperaturas de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40° C controladas em câmara de incubação. Os limiares térmicos inferior e superior foram respectivamente de 0 e 40,4° C e a

temperatura ótima foi de 20,2° C. Para se estudar o crescimento miceliano, esporulação e avaliação colorimétrica das colônias dos isolados, foram utilizados placas de Petri com sete diferentes substratos – Batata Dextrose Ágar (BDA), Solução Czapek Ágar (CZP), Alimento infantil (AI), Caldo de Hortaliças (CH), Cenoura Ágar (CA) e Extrato de soja (ES) e dois regimes de luz. A coloração das colônias foi avaliada com a utilização da carta de cores de Munsell. O crescimento miceliano foi avaliado através da mensuração do diâmetro das colônias com um paquímetro digital e os dados foram expressos em milímetros (mm). A esporulação foi quantificada pela varredura de lâminas preparadas com 10 µL da suspensão de esporos ao microscópio óptico. Os dados foram estimados como número de esporos por cm² de cada substrato e regime de luz. A coloração das colônias variaram de oliva-cinza-escuro (5Y3/2), cinza-escuro (5Y4/1) a cinza claro (5Y7/1) demonstrando que a carta de cores de Munsell pode ser utilizada para fins de eliminar a subjetividade na avaliação colorimétrica de colônias de diferentes fungos. O maior crescimento e esporulação do fungo foram obtidos nos substratos Extrato de Soja com material suscetível (ES-S) e alimento infantil (AI) sob fotoperíodo de 12 horas de luz.

Palavras-chave: Atividade enzimática, limiares térmicos, crescimento e esporulação.

¹ Engenheiro Agrônomo, mestrando do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração em Fitopatologia.

CHARACTERIZATION OF *Corynespora cassicola* ISOLATES FROM SOYBEAN.

ABSTRACT - The fungus *Corynespora cassicola* has been reported causing disease in more than 70 species including the soybean. Was performed a characterization of isolates from different Brazilian soybean regions about the measure, shape, contour of its conidia, enzyme activity, conidia temperature germination, growth, sporulation and color of their colonies. Through microculture plates, 100 conidia of different isolates were measured, and found septa 5-15, 20-300 mm of length 7-15 mm of width. We were found variability in the contour of conidia, classified as straight and curved. For the format, found conidia oval, cylindrical and obclavate. To determine the enzymatic activity of the isolates on solid medium, they were transferred to six different substrates with subsequent calculation of the rate of degradation. The isolates showed variability in the rates of enzymatic degradation ranging from 1,09 to 2,74. Were also determined threshold temperature and optimum temperature for the conidia germination through incubation on water-agar (1%) plates containing 300 mL of conidia suspension for eight hours at temperatures 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40°C controlled by an incubation chamber. The upper and lower threshold temperatures were respectively 40,4 and 0 ° C and the optimum temperature was 20,2 ° C. To study the mycelial growth, sporulation and colorimetric colonies evaluation of the isolates were used Petri dishes with seven different substrates - Potato Dextrose Agar (BDA), Czapek Solution Agar (CZP), Infant Food (AI), Vegetable Broth (CH), carrot agar (CA) and Soy Extract (ES) under two lighting conditions. The color of colonies was assessed

using the Munsell color chart. The mycelial growth was evaluated by measuring the diameter of the colonies with a caliper and the data were expressed in millimeters (mm). Sporulation was quantified by scanning slides by optical microscopy prepared with 10 mL of spore suspension. Data were estimated as the number of spores per cm² for each substrate and the lighting. The colonies coloration ranged from dark olive-gray (5Y3/2), dark gray (5Y4/1) to gray (5Y7/1) demonstrating that the Munsell color chart can be used for purposes of eliminating the subjectivity colorimetric assessment of fungi colonies. The greatest growth and sporulation were obtained on substrates with Suceptible Soy Extract (ES-S) and baby food (AI) under 12 hours of lighting.

Keywords: Enzymatic activity, thermal thresholds, growth and sporulation.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil figura como o segundo maior produtor mundial de soja (CONAB, 2012).

O fungo *Corynespora cassiicola* já foi relatado causado doenças em mais de 70 espécies de plantas hospedeiras (SILVA et al., 1995). O fitopatógeno *C. cassiicola* pertence à classe dos *Deuteromycetes*, subclasse *Hyphomycetidae*, família *Dematiaceae*, gênero *Corynespora* e espécie *C. cassiicola* (BARNET & HUNTER, 1972). O patógeno apresenta conídios isolados ou em cadeia de dois a seis, de coloração marrom oliváceo, dilatados na base, retos ou

ligeiramente curvados, com 4-20 pseudoseptos, medindo de 40-420 µm de comprimento, sendo que em meio de cultura pode chegar a 520 µm x 9-22 µm de espessura (SNOW & BERGGREN, 1989; ELLIS, 1971).

O gênero *Corynespora* foi descrito de forma detalhada por Wei (1950). Posteriormente, Ellis (1957) criou uma chave de identificação para algumas espécies do gênero *Corynespora* baseada em características específicas dos conídios e conidióforos. Dentre os patógenos do gênero *Corynespora* foram descritos 25 espécies por Ellis (1971)

Outra forma de caracterizar diferentes isolados de uma mesma espécie é a sua diferenciação quanto à sua produção enzimática. Dentro dos mecanismos de patogenicidade dos fitopatógenos, Agrios (2005) relacionou cada mecanismo da ação de diferentes enzimas. Segundo o autor, embora alguns patógenos utilizem a força mecânica para penetrar os tecidos da planta, a atividade dos fitopatógenos em plantas são amplamente de natureza química condicionada principalmente a produção de enzimas e toxinas.

Hankin & Anagnostakis (1975) e Paterson & Bridge (1994) descreveram várias metodologias para a detecção da produção de enzimas específicas em meio sólido por fungos. Annakutty (1998) demonstrou em seu trabalho com *C. cassicola* patogênica à seringueira, que este fitopatógeno pode produzir várias enzimas envolvidas no mecanismo de patogênese ao hospedeiro.

Os limiares térmicos e a temperatura ótima para a germinação dos conídios de *C. cassicola* têm sido utilizada para

caracterizar a espécie (SEAMAN & SHOEMAKER, 1965; MULITERNO DE MELO, 2009).

A temperatura ótima para a germinação de conídios de *C. cassiicola* foi de 23°C e os limiares térmicos inferior e superior foram de 7 e 39°C (MULITERNO DE MELO, 2009). Para Seaman & Shoemaker (1965), a temperatura ótima foi de 20°C.

O crescimento miceliano de isolados de *C. cassiicola* têm se mostrado lento em meio de cultura de batata dextrose ágar (BDA) segundo Almeida & Yamashita (1976). Estes autores demonstraram que este fungo apresentou melhor crescimento miceliano nos meios V-8, alimento infantil (AI) e extrato de folhas, hastes e vagens de soja (ES) quando comparado com BDA, malte-ágar (MA) e czapeck-ágar (CZP). Quanto à esporulação, as maiores, foram obtidas em meio V-8 e AI. Olive et al. (1945), obtiveram excelentes esporulações em meio BDA e CZP.

Roim (2001), obteve para isolados provenientes de folhas, maior crescimento miceliano em meio BDA e BDA 500 (meio BDA suplementado com 500 gramas de batata). Segundo esta mesma autora, as melhores esporulações destes isolados foram obtidas em meio BDA com fotoperíodo de doze horas. Também foi feita a classificação dos isolados quanto à coloração de suas colônias neste meio, porém foi utilizado um método subjetivo na avaliação.

Muliterno de Melo (2009) obteve melhor esporulação em meio Czapeck-ágar com papel de filtro e fotoperíodo de doze horas. Almeida & Yamashita (1977) demonstraram também a influência do pH sobre o crescimento e esporulação deste fungo. Os melhores

resultados de crescimento e esporulação obtidos por este autor foi na faixa de pH entre 6,5 a 7,5.

O micélio em meio de cultura é imerso sem a formação de estroma, branco e floculento, tornando-se mais tarde cinza escuro e constituído de um emaranhado preto oliváceo (Snow & Berggren, 1989 e Ellis, 1971).

Quanto à coloração das colônias, é importante a utilização de uma escala colorimétrica objetiva como a descrita por Munsell (1975), onde este autor classifica numericamente as cores com base em uma carta de cores. Este método foi utilizado para a classificação da cor durante a avaliação visual das colônias, eliminando assim a subjetividade nas avaliações.

Os objetivos deste trabalho foram caracterizar os isolados de *C. cassicola* quanto a mensuração e formato dos conídios, expressão enzimática em meio de cultura, determinação dos limiares térmicos inferior, superior e temperaturas ótima para a germinação dos conídios e seu crescimento e esporulação em diferentes substratos e fotoperíodo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fitopatologia / Micologia da Universidade de Passo Fundo (UPF) no período de 24 meses compreendidos nos anos de 2010 e 2011.

2.1 Isolados

Foram utilizados cinco isolados de *C. cassicola* oriundos de diferentes regiões brasileiras (Tabela 1). Os isolados 01/MG, 19/MS e 35/RO foram cedidos por Avozani (2011). O isolado MES307 foi cedido pela Embrapa Soja (Centro Nacional de Pesquisa Soja). O isolado 25/MT foi proveniente de uma amostra de folhas com sintomas de mancha alvo coletada em Lucas do Rio Verde, MT.

Para o isolamento foram cortados 25 discos de 10 mm de regiões com lesões características. Os discos foram submetidos a assepsia com imersão primeiramente em solução de álcool 70% por 1 minuto, depois em solução aquosa de hipoclorito de sódio a 1 % por 3 minutos e lavados três vezes em água destilada. Após este processo de assepsia, os discos foram distribuídos em caixas de acrílico, tipo gerbox (11 x 11 x 3,5 cm de altura), contendo uma espuma de nylon, duas folhas sobrepostas de papel filtro e umedecidos com água destilada esterilizada. O material foi levado para câmara de crescimento sob temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$, fotoperíodo de 12 horas. Na câmara foram dispostos em prateleiras com três lâmpadas fluorescentes de 40 W de potência localizadas a 50 cm acima dos gerboxes.

Após a incubação em câmara de crescimento por um período de quatro dias, as amostras foram avaliadas em microscópio estereoscópico para visualização da estrutura (sinais) do patógeno. Neste momento, as estruturas do patógeno foram coletadas com agulha histológica e transferidas para meio de cultura alimento infantil (ALMEIDA & YAMASHITA, 1975). Após a obtenção desta primeira cultura, o isolado foi purificado através do isolamento monospórico

juntamente com os demais, de acordo com a técnica citada por Fernandez (1993).

Tabela 1 - Identificação e procedência dos isolados de *Corynespora cassiicola*.

Isolado	Tecido	Local	Fonte
01/MG	Folha	Uberlândia/MG	Avozani (2011)
10/MS	Folha	Ponta Porã/MS	Avozani (2011)
25/MT	Folha	Lucas do Rio Verde/MT	Deste estudo
35/RO	Folha	Vilhena/RO	Avozani (2011)
MES307	Folha	Pitanga/PR	Embrapa Soja (1996)

2.2 Isolamento monospórico

Os isolamentos monospóricos foram realizados para os cinco isolados. Após o desenvolvimento das colônias, adicionou-se 10 mL de água destilada esterilizada em cada placa para a remoção dos conídios. A remoção ocorreu pela raspagem com pincel de camelo nº 20. Desta suspensão obtida, foram pipetados 350 µL e dispensados em placas contendo meio água-ágar. A suspensão foi espalhada com o auxílio de uma alça de Drigalsky. Após este processo, as placas foram vedadas com filme plástico e acondicionadas, por oito horas, em câmara de crescimento com temperatura de 25°C ± 2 (FERNANDEZ, 1993). Após este período de incubação, observou-se em microscópio óptico, aumento de 100 vezes, a germinação dos conídios. Com o

auxílio de uma agulha flambada, cortou-se pequenas porções do meio água-ágar, contendo apenas um conídio germinado. Cada fragmento foi transferido para uma placa de petri contendo meio de cultura alimento infantil (AI). As placas foram incubadas por 15 dias em câmara de crescimento sob temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$, fotoperíodo de 12 horas, dispostas em prateleiras com três lâmpadas fluorescentes de 40 W de potência, localizadas a 50 cm das placas. Após o crescimento das culturas provenientes de um único conídio, transferiu-se parte do micélio dos isolados para tubos contendo meio AI, armazenando-os em refrigerador a 5°C (Micoteca do laboratório).

2.3 Mensuração dos conídios

Para a mensuração dos conídios, foram preparadas lâminas através da técnica da microcultura de acordo com a Figura 1 (FERNANDEZ, 1993). Um disco de 5 mm de uma cultura pura de cada isolado, com idade de 15 dias foi recortado e colocado sobre uma lâmina esterilizada. Após esta etapa, sobre o disco foi colocado uma lâminula flambada. Estes conjuntos foram colocados em caixas de acrílico, tipo gerbox (11 x 11 x 3,5 cm de altura) onde o fundo das caixas foram umedecidos para favorecer o desenvolvimento do fungo sobre a lâminula. Estes conjuntos foram levados para câmara de crescimento sob temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$, fotoperíodo de 12 horas, dispostos em prateleiras com três lâmpadas fluorescentes de 40 W de potência, localizadas a 50 cm dos gerboxes. Após quinze dias, foram montadas lâminas com lactofenol para visualização das estruturas e sua mensuração.

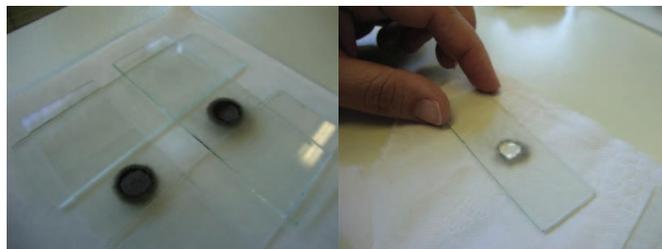


Figura 1 - Montagem de lâminas segundo a técnica de microcultura.

Passo Fundo, RS. 2012.

2.4 Atividade enzimática

Para a determinação da atividade enzimática dos isolados foi utilizada a metodologia descrita por Hankin & Anagnostakis (1975). Foram utilizados os seguintes substratos: 1) Meio Mínimo (HAAs, 1992) contendo 6,0 g de NaNO_3 , 0,5 g de KCl , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5 g KH_2PO_4 , 100 mg de FeSO_4 , 100 mg de ZnSO_4 , 1% (10 g / L) de carboximetilcelulose (CMC), 15 g de ágar, volume completado para 1 L e pH 6,8. A coloração foi realizada com 0,2% de solução vermelho congo e posterior lavagem com solução 0,5 M de NaCl para a determinação da atividade da endoglucanase; 2) Solução de Sais (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975) contendo 2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4 g de KH_2PO_4 , 6 g de Na_2HPO_4 , 0,2 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mg de CaCl_2 , 10 μg de H_3BO_3 , 10 μg de MnSO_4 , 70 μg de ZnSO_4 , 50 μg de CuSO_4 , 10 μg de MoO_3 . Após a obtenção da solução de sais, foi adicionado a 500 mL desta solução, 1 g de extrato de levedura, 5 g de pectina, 15 gramas de ágar e volume completado para 1 L e pH ajustado para pH 7,0 ou pH 5,0 para a determinação da atividade da enzima pectato liase e poligalacturonase respectivamente.

Foi utilizado uma solução 2N de iodo para revelar a área de degradação; 3) Amido Solúvel (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975) contendo 0,2 % de amido solúvel, 15 gramas de ágar, pH 6,0 e volume completado para 1 L. Para a determinação da atividade amilolítica foi utilizado uma solução 2N de iodo; 4) Meio Tween (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975) contendo 10 g de peptona, 5 g de NaCl, 0,1 g de CaCl₂.2H₂O, 20 g de ágar, volume completado para 1 L. Foi autoclavado separadamente o Tween 20. Após autoclavagem do mesmo, foi adicionado na proporção de 1 mL de Tween 20 para cada 100 mL de meio resfriado a temperatura ambiente. Para a determinação da atividade lipolítica, foi utilizado uma solução de iodo 2N; 5) Meio de Gelatina (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975) contendo 0,4% de gelatina incolor, 15 g de ágar. Uma solução 8% de gelatina foi autoclavada separadamente e após autoclavada, foi adicionada no meio estéril na taxa de 5 mL para cada 100 mL de meio. Para a determinação da atividade proteolítica foi apenas visualizado a área de degradação.

Para a determinação do índice de degradação para todas as enzimas estudadas, foi medido com um paquímetro digital, o diâmetro da colônia (mm) e também o diâmetro da colônia juntamente com o halo de degradação (mm). Após a obtenção destes valores, foi calculado o índice de degradação segundo a equação:

$$(1) \text{Índice de degradação} = \frac{\text{diâmetro total (halo de degradação + colônia)}}{\text{diâmetro da colônia}}$$

2.5 Limiares térmicos

Para determinar os limiares térmicos inferior, superior e a temperatura ótima para a germinação dos conídios do isolado 25/MT de *C. cassicola*, foi utilizado o substrato água-ágar em pH 7,0. Para cada tratamento foram utilizadas quatro repetições. O inóculo para a realização dos testes foi cultivado em meio alimento infantil por 15 dias sob fotoperíodo de 12 horas e temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$. Após esta etapa, foram adicionados 10 ml de água na placa para remoção dos conídios com auxílio de pincel de camelo nº 20 para compor um suspensão de conídios. Desta suspensão foram pipetados 350 μL e dispensados em placas de petri contendo ágar-água a 1%. As placas foram incubadas durante 8 horas nas temperaturas de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C que foram proporcionadas por câmara controlada.

Foram avaliados 100 conídios em microscópio óptico, aumento de 100 vezes para cada tratamento. Foram considerados conídios germinados aqueles onde o pró-micélio ou tubo germinativo apresentaram comprimento igual ao maior diâmetro do conídio (ZADOKS & SCHEIN, 1979; MULITERNO DE MELO, 2009). Neste mesmo momento, para cada tratamento, foi avaliado o tipo da germinação de acordo com Seaman e Shoemaker (1965), descrevendo se a mesma foi dos tipos: i) basal, ou seja pró-micélio ou tubo germinativo se formando a partir da base do conídio ou próximo ao hilo; ii) apical, ou seja pró-micélio ou tubo germinativo se formando a partir do ápice do conídio ou seja do lado contrário ao hilo; iii) bipolar, ou seja pró-micélio ou tubo germinativo se formando a partir

do ápice e da base concomitantemente; e iv) intercalar, ou seja pró-micélio ou tubo germinativo se formando a partir de outras partes do conídio que não sejam a base ou ápice do mesmo.

Os dados de germinação total foram submetidos à análise de regressão para a construção de um modelo visando a estimativa dos limiares térmicos superior, inferior e temperatura ótima. De acordo com os dados encontrados por Muliterno de Melo (2009) e Seaman & Shoemaker (1965) o modelo que expressa a relação entre germinação de conídios (%) e temperatura (°C) é do tipo polinomial quadrático ou seja da forma $ax^2 + bx + c=0$.

Para cálculo da temperatura ótima foi utilizado o “X” do vértice (X_v), onde o $X_v = \frac{-b}{2a}$.

Os limiares térmicos inferior e superior foram calculados igualando se a equação polinomial quadrática a 1, onde $ax^2 + bx + c = 1$. Após esta etapa para o cálculo foi utilizado a fórmula de báskara de acordo com $X = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$.

2.6 Crescimento miceliano e esporulação

Foram utilizados cinco isolados oriundos de diferentes regiões brasileiras (Tabela 1). Os sete substratos utilizados foram: 1) Batata Dextrose Ágar (BDA) cuja composição por litro foram 200 gramas de batata, 20 gramas de dextrose, 18 gramas de ágar, 0,3 gramas de estreptomina, 1 L de água destilada (TUIITE, 1969); 2) Solução Czapek Ágar (CZP) cuja composição por litro foram de 30

gramas de sacarose, 2 gramas de NaNO_3 , 1 grama de K_2HPO_4 , 0,5 grama de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 grama de KCl , 0,01 grama de FeSO_4 , 0,3 gramas de estreptomicina, 20 gramas de ágar e 1 L de água destilada (TUIITE, 1969); 3) Caldo de Hortaliças (CH) cuja composição por litro foi de 74 gramas de batata, 74 gramas de beterraba, 74 gramas de abóbora, 74 gramas de cenoura, 74 gramas de taioba, 74 gramas de tomate, 74 gramas de repolho, 74 gramas de couve, 74 gramas de cebolinha, 74 gramas de salsa, onde após o cozimento desses vegetais e obtenção do caldo, foram adicionados 0,3 gramas de estreptomicina, 10 gramas de ágar e volume completado com água destilada para 1 L. Para facilitar o processo de preparo do caldo, o autor descreve como sendo utilizados 400 gramas de cada vegetal perfazendo no final um volume de 5,4 L que pode ser congelado em porções de 600 ml (PEREIRA et al. 2003); 4) Cenoura Ágar (CA) cuja composição por litro foi de 20 gramas de cenoura raiz ralada em 400 ml de água destilada mantidos em repouso por 60 minutos e em seguida fervidos por cinco minutos, 0,3 gramas de estreptomicina, 18 gramas de ágar e volume completado para 1 L (TUIITE, 1969); 5) Alimento Infantil (AI) cuja composição por litro é de 10 gramas de alimento infantil composto por caldo de vegetais, 0,3 gramas de estreptomicina, 18 gramas de ágar e volume completado para 1 L (ALMEIDA & YAMASHITA, 1976); 6) Extrato de Soja MR (ES-MR) cuja composição por litro foi de 50 gramas de folha, 50 gramas de hastes, 50 gramas de vagens de soja moderadamente resistente à mancha alvo, trituradas em liquidificador e coadas, foram acrescentadas 0,3 gramas de estreptomicina, 18 gramas de ágar e volume completado para 1 L. O cultivar utilizado foi BRS Valiosa RR

(adaptado de ALMEIDA & YAMASHITA, 1976); 7) Extrato de Soja S (ES-S) cuja composição por litro foram de 50 gramas de folha, 50 gramas de hastes, 50 gramas de vagens de soja suscetível à mancha alvo, trituradas e coadas, foram acrescentadas 0,3 gramas de estreptomicina, 18 gramas de ágar e volume completado para 1 L. O cultivar utilizado foi M8336RR (adaptado de ALMEIDA & YAMASHITA, 1976).

Os tratamentos denominados de fotoperíodo foram aqueles expostos a 12 horas de luz e 12 horas de escuro. As placas de Petri foram distribuídas ao acaso em câmara de crescimento com lâmpadas OSRAM universal, 40 watts, situadas a 50 cm acima das placas sob temperatura de $25\pm 2^{\circ}$ C. Para as placas referentes aos tratamentos denominados de escuro, antes de serem colocados em câmara de crescimento, foram envolvidas por camada dupla de folha de papel alumínio e distribuídas ao acaso na câmara sob as mesmas condições de temperatura.

Para cada tratamento ou combinação dos fatores estudados, foram utilizadas quatro repetições e o experimento foi repetido duas vezes.

A avaliação foi realizada quando o crescimento miceliano de um dos isolados atingiu a borda da placa de Petri.

Visando eliminar a subjetividade na avaliação da cor das colônias, foi utilizada a escala de Munsell (1975). A escala de Munsell é largamente utilizada na avaliação da coloração de solos, porém devido à sua larga aplicabilidade e por contemplar as principais cores referentes às colônias do fungo em estudo, a mesma foi utilizada no presente trabalho.

Para avaliação do crescimento miceliano foi mensurado o diâmetro das colônias utilizando um paquímetro digital e os dados obtidos foram expressos em milímetros (mm).

A esporulação foi avaliada da seguinte forma: i) foram dispensados 10 mL de água destilada esterilizada sobre cada placa de Petri e em seguida foi realizada a remoção dos conídios pela raspagem da superfície da colônia com auxílio de pincel de camelo nº 20; ii) um mililitro desta suspensão concentrada foi diluído em nove mililitros de água destilada esterilizada; iii) foram coletadas quatro sub-amostras de dez microlitros (μL) da suspensão diluída para cada combinação ou tratamento de cada repetição e realizada a quantificação do número de esporos, sob microscópio óptico, neste volume. Os dados foram estimados como número de esporos por cm^2 do substrato. A análise dos dados do crescimento miceliano (mm) e da esporulação (esporos/ cm^2) foi feita segundo um desenho experimental de fatorial triplo com blocos casualizados. Após detectado a diferença entre os tratamentos quanto ao crescimento miceliano e esporulação, foi aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os conídios de *C. cassicola* estão representados na Figura 2. Os resultados obtidos para o comprimento (μm), largura (μm) e número de septos encontram-se na Tabela 2. O comprimento (μm) e largura (μm) são coincidentes com os descritos por Ellis (1971) e Rinzo & Kitazawa (1980) variando de 20 a 300 μm . Quanto ao número de septos e largura, os dados encontrados foram similares com

aqueles descritos por Ellis (1971), Seaman *et al.* (1965) e Rinzo & Kitazawa (1980) sendo encontrados valores de 5 a 15 septos e 7 a 15 μm de largura. Todos os valores obtidos foram maiores que aqueles obtidos por Avozani (2001), provavelmente devido à alteração do meio de cultura utilizado para o crescimento dos isolados sob a técnica de microcultura. O formato (Figura 3) variou de reto, ou seja, sem nenhuma curvatura a curvo, de acordo com o descrito por diversos autores (ELLIS, 1971; SEAMAN *et al.* 1965; RINZO & KITAZAWA, 1980; NGHIA *et al.*, 2008). O contorno (Figura 4) variou de oval, cilíndrico a oblavado. Houve grande variabilidade entre os isolados tanto para formato quanto para o contorno de seus conídios concordando com os resultados obtidos por NGHIA *et al.* (2008) avaliando isolados de seringueira. Não foi encontrado nenhum trabalho em literatura, onde foi avaliado estas características de formato e contorno para isolados de *C. cassicola* provenientes de soja.

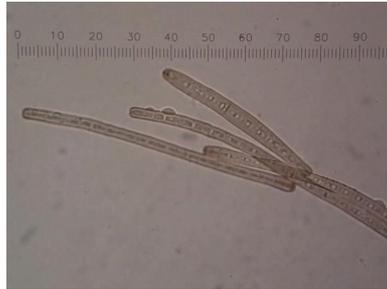


Figura 2 - Conídios de *Corynespora cassicola* do isolado 25/MT de soja.

Tabela 2 - Comprimento (μm), largura (μm) e número de septos dos conídios dos isolados de *C. cassicola* de soja. Passo Fundo, RS. 2012.

Isolado	Comprimento (μm)			Largura (μm)			Septos (n°)		
	Min.	Max.	Média \pm Desvio	Min.	Max.	Média \pm Desvio	Min.	Max.	Média \pm Desvio
01/MG	30,0	300,0	174,4 \pm 7,8	7,0	10,0	8,7 \pm 0,2	3,0	22,0	15,4 \pm 0,7
19/MS	20,0	200,0	94,2 \pm 6,7	9,0	10,0	9,8 \pm 0,1	1,0	17,0	5,0 \pm 0,5
25/MT	90,0	300,0	187 \pm 7,7	8,0	11,0	9,3 \pm 0,1	4,0	22,0	15,5 \pm 0,6
35/RO	80,0	300,0	172,8 \pm 7,6	8,0	10,0	9,6 \pm 0,1	3,0	18,0	10,6 \pm 0,6
MES307	51,0	230,0	123,14 \pm 6,5	10,0	15,0	14,0 \pm 0,3	3,0	13,0	6,3 \pm 0,3
\bar{X}	54,2	266,0	150,3 \pm 7,3	8,4	11,2	10,3 \pm 0,1	2,8	18,4	10,6 \pm 0,5

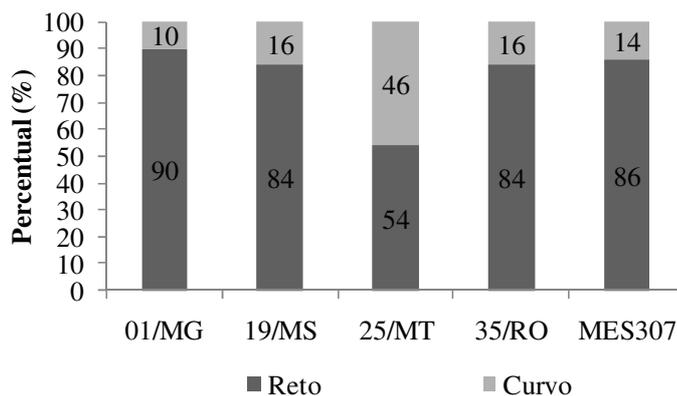


Figura 3 - Contorno dos conídios de *Corynespora cassicola*, isolados de soja.

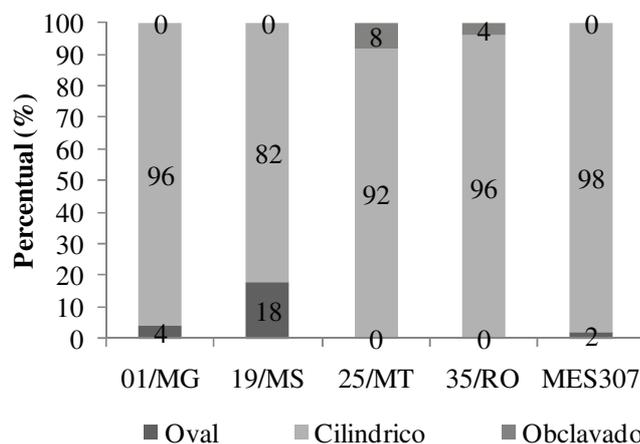


Figura 4 - Formato dos conídios de *Corynespora cassiicola*, isolados de soja.

Os índices de degradação enzimática encontram-se na Tabela 3, e na Figura 5, pode ser visualizado os halos de degradação para as diferentes enzimas avaliadas. Para as enzimas endoglucanase (END), poligalacturonase (POL) e pectato liase (PEC), o isolado MES307 apresentou os maiores índices de degradação (ID). Para a enzima lipase (LIP) o isolado 25/MT apresentou o maior ID. No caso da enzima amilase (AMI), o isolado 01/MG apresentou o maior ID e para a enzima protease (PRO) o isolado 35/RO apresentou o maior ID. O maior ID foi obtido para as enzimas protease e amilase seguidos das enzimas lipase, poligalacturonase, pectato liase e endoglucanase. Estes resultados demonstram que há uma variabilidade na produção de enzimas para os diferentes isolados de *C. cassiicola* de soja, sugerindo que em experimentos visando conhecer a reação de cultivares, deve

ser utilizada uma mistura de isolados ou combinar resultados de diferentes isolados para uma mesma cultivar.

Tabela 3 - Índice de degradação enzimática dos isolados de *Corynespora cassiicola*.

Isolados	Enzimas						\bar{x}
	END	POL	PEC	LIP	AMI	PRO	
01/MG	1,16 bD	1,20 bD	1,09bD	1,68 bC	2,69 aA	2,25 bcB	1,68 ab
19/MS	1,17 bCD	1,16 bCD	1,11bD	1,31 cC	1,66 cB	2,02 cA	1,41 b
25/MT	1,16 bC	1,23 bC	1,18bC	2,40 aA	2,01 bcB	1,93 cB	1,65 ab
35/RO	1,15 bC	1,25 bBC	1,18bBC	1,54 bcB	2,44 abA	2,74 aA	1,72 ab
MES-307	1,63 aB	1,51 aB	1,69aB	1,83 bB	2,39 abA	2,56 abA	1,93 a
\bar{x}	1,21 C	1,25 C	1,24 C	1,68 B	2,17 A	2,24 A	1,63

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.

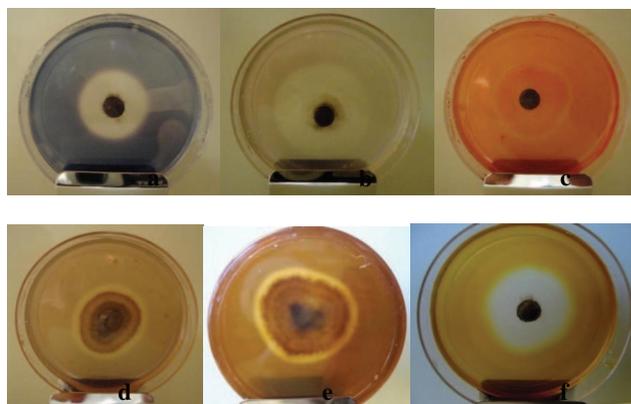


Figura 5 - Detecção de enzimas em meio sólido produzidas por *Corynespora cassiicola*.

Sendo: a) amilase; b) protease; c) endoglucanase; d) pectato liase; e) poligalacturonase; f) lipase.

O tipo da germinação encontra-se na Tabela 4 e Figura 6. Os dados são diferentes daqueles obtidos por Seaman & Shoemaker (1965), pois os autores obtiveram maior percentual de germinação para o tipo basal enquanto que no presente trabalho o maior percentual foi obtido para o tipo bipolar. Não foi encontrado nenhum outro trabalho na literatura demonstrando o tipo da germinação dos conídios de *C. cassicola*.



Figura 6 - Germinação de conídios de *Corynespora cassicola* isolado 25/MT em função da temperatura (°C).

Tabela 4 – Percentual e tipo de germinação dos conídios de *Corynespora cassicola* do isolado 25/MT em diferentes temperaturas.

Temperatura (° C)	Germinação dos conídios (%)				
	Bipolar (%)	Basal (%)	Apical (%)	Intercalar (%)	Total (%)
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5	1,8	1,0	0,0	0,0	2,8
10	34,8	10,8	7,2	0,0	52,8
15	54,5	24,5	2,8	0,0	81,8
20	69,8	16,3	6,3	0,0	92,4
25	44,0	22,0	3,5	0,0	69,5
30	43,5	11,0	2,3	0,0	56,8
35	29,3	7,8	2,3	0,0	39,4
40	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

A partir dos percentuais totais de germinação em cada temperatura após 8 horas, foi construído um modelo matemático para estimar as temperaturas ótima e limiares térmicos superior e inferior (Figura 7). A temperatura ótima encontrada para o isolado de *C. cassicola* 25/MT foi de 20,2°C concordando com os dados de Seaman & Shoemaker (1965) e se aproximando do resultado obtido por Muliterno de Melo (2009) que foi de 23°C. Os limiares térmicos inferior e superior foram respectivamente de 0 e 40,4°C. Os dados obtidos para os limiares inferior e superior se aproximam daqueles obtidos por Muliterno de Melo (2009), demonstrando que o fungo *C. cassicola* apresenta grande amplitude térmica para que ocorra a germinação de seus conídios.

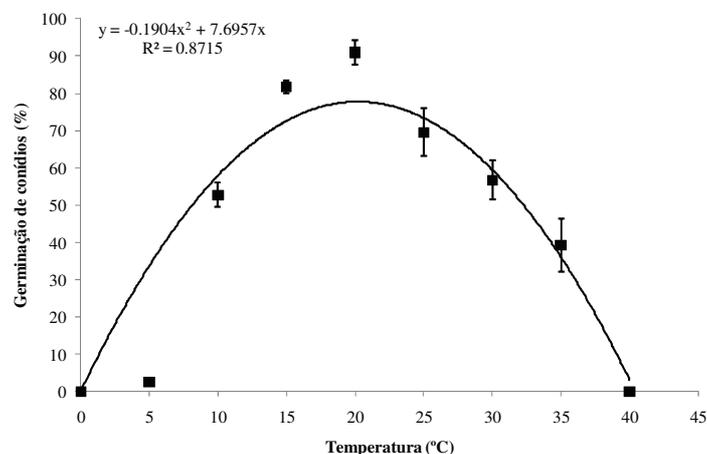


Figura 7 – Regressão para germinação de esporangios de *Corynespora cassiicola* isolado 25/MT em função da temperatura (°C).

Quanto à coloração das colônias, houveram diferenças para as mesmas dentre os cinco isolados de *C. cassiicola* nos diferentes substratos e regimes de luz (Figura 8). Sendo que nesta figura, as letras correspondem aos isolados: A (IS-01/MG), B (IS-19/MS), C (IS-25/MT), D (IS-35/RO) e E (MES-307). O primeiro número logo após a letra refer-se ao substrato, sendo: 1 (AI), 2 (BDA), 3 (CZP), 4 (CH), 5 (CA), 6 (ES-MR) e 7 (ES-S). O número após ao referente a substrato esta relacionado com o fotoperíodo, ou seja 1 refere-se a fotoperíodo e 2 a escuro.

No momento da avaliação, as placas de Petri contendo a colônia foram abertas e colocadas logo abaixo da carta de classificação de cores. Através da comparação com a cor padrão da carta, foi anotado o código referente a cor e o nome comum da mesma para fins de classificação. A coloração das colônias variaram de oliva-

cinza-escuro (5Y3/2), cinza-escuro (5Y4/1) a cinza claro (5Y7/1) para todos os isolados testados (Tabela 5). A coloração obtida no presente trabalho são semelhantes as descritas por Ellis (1971), Snow & Berggren (1989) e Roim (2001), onde os autores classificaram a cor da colônia de *C. asiicola* como olivácea ou cinza. Apenas o isolado MES307 apresentou uma única coloração para todos os meios e luminosidade testados.

Quanto ao crescimento miceliano, houve diferenças significativas para o (Tabela 6). O maior crescimento (diâmetro em mm) ocorreu nos meios extrato de soja MR (ES-MR), extrato de soja S (ES-S) e AI quando comparados com os crescimentos obtidos nos meios BDA, CZP, CV e CA, semelhante aos resultados obtidos por Almeida & Yamashita (1976). Detectaram-se diferenças significativas no crescimento (mm) para os isolados utilizados. O regime de luz não afetou diretamente o crescimento miceliano dos isolados nos substratos avaliados, porém no caso do isolado MES-307 o maior crescimento foi observado no meio ES em condições de escuro.

A esporulação está apresentada na Tabela 6. A condição de fotoperíodo correspondente a fotoperíodo de 12 horas, favoreceu a esporulação (ALMEIDA & YAMASHITA, 1977; MULITERNO DE MELO, 2009). A maior esporulação (esporos/cm²) foi obtida no meio AI confirmando os dados obtidos por Almeida & Yamashita (1976). Porém ocorreram diferenças entre os isolados testados. Considerando-se os isolados tem-se: 1) IS-01/MG: a maior esporulação foi obtida nos meios ES-S e BDA respectivamente; 2) IS-19/MS: a maior esporulação foi obtida nos meios ES-S, CV, AI e BDA respectivamente. 3) IS-25/MT: a maior esporulação foi obtida nos

meios AI e BDA respectivamente; 4) IS-35/RO: a maior esporulação foi obtida nos meios AI e BDA respectivamente 5) MES-307: não foi detectado esporulação após o tempo de crescimento das culturas, pois este isolado apresentou um desenvolvimento lento em comparação com os demais. Roim (2001) também obteve baixa esporulação para este isolado em acordo com o presente trabalho. Também ocorreu a menor esporulação dos isolados quando se comparou o extrato de soja proveniente de cultivar moderadamente resistente (cultivar BRS Valiosa RR) com material suscetível (cultivar M8336RR) de acordo com a Tabela 3. Este fato pode demonstrar que houve efeito da composição química da planta moderadamente resistente, na redução da esporulação do fungo. Isso sugere que podem ser conduzidos outros estudos sobre o efeito de extratos de cultivares com reação diferenciada, na esporulação de *C. cassicola*.

	Isolados									
MEIO	IS-01/MG		IS-19/MS		IS-25/MT		IS-35/RO		MES-307	
AI										
	A1.1	A1.2	B1.1	B1.2	C1.1	C1.2	D1.1	D1.2	E1.1	E1.2
BDA										
	A2.1	A2.2	B2.1	B2.2	C2.1	C2.2	D2.1	D2.2	E2.1	E2.2
CZP										
	A3.1	A3.2	B3.1	B3.2	C3.1	C3.2	D3.1	D3.2	E3.1	E3.2
CV										
	A4.1	A4.2	B4.1	B4.2	C4.1	C4.2	D4.1	D4.2	E4.1	E4.2
CA										
	A5.1	A5.2	B5.1	B5.2	C5.1	C5.2	D5.1	D5.2	E5.1	E5.2
ES-MR										
	A6.1	A6.2	B6.1	B6.2	C6.1	C6.2	D6.1	D6.2	E6.1	E6.2
ES-S										
	A7.1	A7.2	B7.1	B7.2	C7.1	C7.2	D7.1	D7.2	E7.1	E7.2

Figura 8 - Morfologia de colônias de isolados de *Corynespora cassiicola* sob influência de diferentes substratos e regime de luz.

Tabela 5 - Classificação colorimétrica das colônias de isolados de *Corynespora cassiicola* segundo a escala de Munsell (1975).

Meio	Cor	Isolados				
		IS-01/MG	IS-19/MS	IS-25/MT	IS-35/RO	MES-307
AI	Código	A1.1 (5Y5/1)	B1.1 (5Y5/1)	C1.1 (5Y5/1)	D1.1 (5Y5/1)	E1.1 (5Y7/1)
	Nome	cinza	cinza	cinza	cinza	cinza claro
	Código	A1.2 (5Y7/1)	B1.2 (5Y6/1)	C1.2 (5Y6/1)	D1.2 (5Y6/1)	E1.2 (5Y7/1)
	Nome	cinza claro	cinza	cinza	cinza	cinza claro
BDA	Código	A2.1 (5Y3/2)	B2.1 (5Y3/2)	C2.1 (5Y5/1)	D2.1 (5Y3/2)	E2.1 (5Y7/1)
	Nome	oliva cinza escuro	oliva cinza escuro	cinza	oliva cinza escuro	cinza claro
	Código	A2.2 (5Y7/1)	B2.2 (5Y7/1)	C2.2 (5Y7/1)	D2.2 (5Y7/1)	E2.2 (5Y7/1)
	Nome	cinza claro	cinza claro	cinza claro	cinza claro	cinza claro
CZP	Código	A3.1 (5Y3/2)	B3.1 (5Y3/2)	C3.1 (5Y3/2)	D3.1 (5Y3/2)	E3.1 (5Y7/1)
	Nome	oliva cinza escuro	oliva cinza escuro	oliva cinza escuro	oliva cinza escuro	cinza claro
	Código	A3.2 (5Y7/1)	B3.2 (5Y7/1)	C3.2 (5Y7/1)	D3.2 (5Y7/1)	E3.2 (5Y7/1)
	Nome	cinza claro	cinza claro	cinza claro	cinza claro	cinza claro
CH	Código	A4.1 (5Y5/1)	B4.1 (5Y5/1)	C4.1 (5Y5/1)	D4.1 (5Y5/1)	E4.1 (5Y7/1)
	Nome	Cinza	cinza	cinza	cinza	cinza claro
	Código	A4.2 (5Y7/1)	B4.2 (5Y7/1)	C4.2 (5Y7/1)	D4.2 (5Y7/1)	E4.2 (5Y7/1)
	Nome	cinza claro	cinza claro	cinza claro	cinza claro	cinza claro
CA	Código	A5.1 (5Y4/1)	B5.1 (5Y4/1)	C5.1 (5Y4/1)	D5.1 (5Y4/1)	E5.1 (5Y7/1)
	Nome	cinza escuro	cinza escuro	cinza escuro	cinza escuro	cinza claro
	Código	A5.2 (5Y7/1)	B5.2 (5Y7/1)	C5.2 (5Y7/1)	D5.2 (5Y7/1)	E5.2 (5Y7/1)
	Nome	cinza claro	cinza claro	cinza claro	cinza claro	cinza claro
ES-MR	Código	A6.1 (5Y6/1)	B6.1 (5Y6/1)	C6.1 (5Y6/1)	D6.1 (5Y6/1)	E6.1 (5Y7/1)
	Nome	Cinza	cinza	cinza	cinza	cinza claro
	Código	A6.2 (5Y7/1)	B6.2 (5Y7/1)	C6.2 (5Y7/1)	D6.2 (5Y7/1)	E6.2 (5Y7/1)
	Nome	cinza claro	cinza claro	cinza claro	cinza claro	cinza claro
ES-S	Código	A7.1 (5Y6/1)	B7.1 (5Y6/1)	C7.1 (5Y6/1)	D7.1 (5Y6/1)	E7.1 (5Y7/1)
	Nome	Cinza	cinza	cinza	cinza	cinza claro
	Código	A7.2 (5Y7/1)	B7.2 (5Y7/1)	C7.2 (5Y7/1)	D7.2 (5Y7/1)	E7.2 (5Y7/1)
	Nome	cinza claro	cinza claro	cinza claro	cinza claro	cinza claro

Tabela 6 – Crescimento miceliano e esporulação dos isolados de *Corynespora cassiicola* em diferentes substratos e regime de luz.

Meio	Regime de luz	Fator	Isolados					\bar{X}
			IS-01/MG	IS-19/MS	IS-25/MT	IS-35/RO	MES-307	
AI	Fotoperíodo	Crescimento (mm)	67,5 abAB	63,8 abB	67,0 deAB	69,5 abcA	9,8 efgC	55,6 bc
		Esporulação (conídios / cm ²)	25x10 ³ cC	28x10 ³ bc	47x10 ³ aB	92x10 ³ aA	0,0 aD	38x10 ³ a
	Escuro	Crescimento (mm)	56,8 cB	58,2 bB	69,3 cdeA	69,5 abcA	13,3 dC	53,4 cd
		Esporulação (conídios / cm ²)	0,0 gB	1x10 ³ eB	0,7x10 ³ gB	48x10 ³ cA	0,0 aB	10x10 ³ e
BDA	Fotoperíodo	Crescimento (mm)	45,7 dBC	41,7 cdeC	64,2 eA	52,9 eB	7,2 gD	42,3 fg
		Esporulação (conídios / cm ²)	34x10 ³ bB	27x10 ³ bC	35,8x10 ³ bB	59x10 ³ bA	0,0 aD	31x10 ³ b
	Escuro	Crescimento (mm)	40,9 defC	41,41 cdeC	69,4 cdeA	48,8 eB	11,5 defD	42,4 fg
		Esporulação (conídios / cm ²)	0,0 gB	0,0eB	5,5x10 ³ eA	0,0 fB	0,0 aB	1,1x10 ³ g
CZP	Fotoperíodo	Crescimento (mm)	37,8 eFC	62,6 abA	51,8 fB	33,0 fC	8,7 fgD	38,8 h
		Esporulação (conídios / cm ²)	8,1x10 ³ eAB	64x10 ³ cdB	3,6x10 ³ eFC	8,7x10 ³ efA	0,0 aD	5,3x10 ³ f
	Escuro	Crescimento (mm)	35,4 fC	60,6 abA	54,0 fB	31,7 fC	12,9 deD	38,9 h
		Esporulação (conídios / cm ²)	0,0 gC	0,5x10 ³ eA	0,2x10 ³ gB	0,0 fC	0,0 aC	140,9 g
CH	Fotoperíodo	Crescimento (mm)	43,9 deC	47,3 cC	64,5 eA	57,2 deB	8,96 fgD	44,36 f
		Esporulação (conídios / cm ²)	3,8x10 ³ fCD	29x10 ³ bB	7,7x10 ³ dC	40x10 ³ cA	0,0 aD	16,1x10 ³ d
	Escuro	Crescimento (mm)	43,2 defA	45,9 cdA	42,6 gA	54,2 eA	11,3 defB	39,4 gh
		Esporulação (conídios / cm ²)	0,0 gB	0,0 eB	0,0 gB	5,6x10 ³ fA	0,0 aB	1,1x10 ³ g
CA	Fotoperíodo	Crescimento (mm)	58,6 cB	36,2 deC	72,9 bcA	69,7 abcA	10,2 defgD	49,5 e
		Esporulação (conídios / cm ²)	20,0x10 ³ dA	5x10 ³ dC	3x10 ³ fCD	15,7x10 ³ eB	0,0 aD	8,9x10 ³ e
	Escuro	Crescimento (mm)	56,7 cB	33,6 eC	79,4 aA	64,3 cdB	18,6 cD	50,5 de
		Esporulação (conídios / cm ²)	0,0 gB	1,6x10 ³ eA	0,3x10 ³ gB	0,0 fB	0,0 aB	0,37x10 ³ g
ES-MR	Fotoperíodo	Crescimento (mm)	70,5 aBC	68,8 abC	72,7 bcdB	77,0 aA	9,5 fgD	59,7 a
		Esporulação (conídios / cm ²)	10,9x10 ³ eA	7,8x10 ³ cB	0,8x10 ³ gC	7x10 ³ efB	0,0 aC	5,5x10 ³ f
	Escuro	Crescimento (mm)	62,3 bcB	61,1 abB	76,6 abA	73,9 abcA	27,9 aC	60,36 a
		Esporulação (conídios / cm ²)	0,0 gA	0,0 eA	0,0 gA	0,0 fA	0,0 aA	0,0 g
ES-S	Fotoperíodo	Crescimento (mm)	67,3 abB	70,8 aAB	70,5 cdB	75,0 abA	9,11 fgC	58,5 ab
		Esporulação (conídios / cm ²)	38,0x10 ³ aA	41,5x10 ³ aA	10,9x10 ³ cC	31x10 ³ dB	0,0 aD	24x10 ³ c
	Escuro	Crescimento (mm)	70,0 abB	70,4 aB	76,4 abA	67,0 bcdB	24,4 bC	61,7 a
		Esporulação (conídios / cm ²)	0,0 gC	1,6x10 ³ eB	92,6 gC	2,8x10 ³ fA	0,0 aC	0,9x10 ³ g
\bar{X}	Crescimento (mm)		54,0 C	54,45 C	66,5 A	60,3 B	13,1 D	49,68
	Esporulação (conídios / cm ²)		10,0x10 ³ B	10,7x10 ³ B	8,3x10 ³ C	22x10 ³ A	0,0 D	10,2x10 ³
	C.V.%		6,3					
		Esporulação (conídios / cm ²)		C.V.%		17,7		

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.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existe grande variabilidade no comprimento (μm), largura (μm), número de septos, contorno e formato dos conídios dos isolados de *C. cassiicola*.

A técnica descrita por Hankin & Anagnostakis (1975), para determinar a expressão enzimática de fungos em meio sólido pode ser utilizada para determinar a expressão enzimática de *C. cassiicola* em meio sólido.

A temperatura de 20,2 °C foi calculada através do modelo matemático como a temperatura ótima para a germinação dos conídios do isolado de soja 25/MT de *C. cassiicola*.

O método de avaliação colorimétrica das colônias através do uso da carta de cores de Munsell pode ser utilizado eliminando a subjetividade na avaliação.

Os melhores substratos para o crescimento e esporulação de *C. cassiicola* foram o extrato de folha de soja de cultivar suscetível e o alimento infantil sob fotoperíodo de 12 horas a 25°C, porém há diferentes respostas entre os isolados.

O efeito de extratos foliares de cultivares de soja com diferentes reações à mancha-alvo, sobre a esporulação de *C. cassiicola* deve merecer trabalhos mais aprofundados.

CAPÍTULO II

REAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA À MANCHA-ALVO

ANTÔNIO SÉRGIO FERREIRA FILHO¹

RESUMO – O Brasil ocupa posição de destaque na produção mundial de grãos, contribuindo para este lugar no cenário mundial, a soja. Dentre algumas doenças de importância na produção da cultura, destaca-se a mancha-alvo causada pelo fungo *Corynespora cassiicola*. Foram utilizados isolados de diferentes regiões sojícolas do Brasil para definir metodologias na avaliação da reação à mancha-alvo em diferentes cultivares comerciais de soja. Foram comparadas quatro metodologias para inoculação: M-1) inoculação à campo; M-2) inoculação com período pós inoculação de 48 horas em câmara úmida; M-3) inoculação com período pós inoculação de 48 horas em câmara úmida associada com molhamento foliar noturno mantido, simulando as condições de orvalho à campo; M-4) folha destacada. Os métodos 3 e 4 apresentaram lesões com tamanho variando de 2 a 14,3 (mm) muito similares aos tamanhos obtidos à campo que variaram de 2,1 a 9,14 (mm). Foi construído uma curva de resposta para o número de lesões no folíolo central e para diâmetro das lesões (mm) em função de diferentes concentrações de conídios ou micélio triturado / mL de suspensão. Foram utilizadas concentrações de 15×10^3 , 45×10^3 , 60×10^3 conídios / mL e 5×10^3 , 25×10^3 , 50×10^3 e 100×10^3 fragmentos de micélio triturado / mL. As concentrações de 30 a 50×10^3 apresentaram número de lesões e tamanho de lesão satisfatórios e não

ocorreram coalescência das lesões nestas concentrações. Foram utilizados vasos com as plantas apresentando quatro trifólios completamente desenvolvidos de BMX PotênciaRR, Hutcheson, M8336RR, M8360RR, M-Soy 8001, NK 7059RR (V-maxRR) e TMG 113RR. Foram utilizados dois isolados (IS-01/MG e MES307), quatro repetições e o experimento foi repetido duas vezes. Suspensões de 45×10^3 conídios/mL para o isolado 01/MG e 45×10^3 micélios triturados/mL para o isolado MES307 foram utilizadas para as inoculações. Foram avaliados a desfolha (%), a incidência (%), o número de lesões e o tamanho da lesão (mm). Os cultivares que mais apresentaram desfolha foram os cultivares M-Soy 8001 e TMG 113RR demonstrando que estes cultivares podem ser mais sensíveis à produção de toxinas pelos isolados de *C. cassicola*. Os que apresentaram maior incidência foram os cultivares NK 7059RR e Hutcheson podendo ser um indicativo de que estes cultivares apresentaram uma hipersensibilidade ao patógeno pois mesmo com a maior incidência, apresentaram os menores índices de desfolha, número de lesões e tamanho de lesão. Os que apresentaram maior número lesões foram os cultivares M-Soy 8001 e TMG 113RR indicando que estes cultivares são mais sensíveis à penetração do patógeno. Os maiores tamanho de lesão (mm) foram encontrados para BMX PotênciaRR e M-Soy 8001 demonstrando que estes cultivares são mais sensíveis à colonização do patógeno.

Palavras Chave: Concentração de inóculo, *Glycine max*, reação de cultivares

¹ Engenheiro Agrônomo, mestrando do programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração em Fitopatologia.
antonio.sergio@monsanto.com

REACTION OF SOYBEAN CULTIVARS TO TARGET LEAF SPOT

ABSTRACT - Brazil occupies a prominent position in world grain production, contributing to this place on the world, soybeans. Among some diseases of importance in the production, there is target leaf spot caused by *Corynespora cassiicola*. We used isolates from different Brazilian soybeans regions for determine methodologies to define the symptoms reproduction of the target spot in different soybeans cultivars. We compared four inoculation techniques: M-1) inoculation on the field, M-2) inoculation with 48 hours in a moist chamber post inoculation; M-3) inoculation with 48 hours in a moist chamber post inoculation associated with leaf wetness kept for overnight, simulating the conditions on the field, M-4) detached leaves. Methods 3 and 4 had lesions with size ranging from 2 to 14.3 (mm) very similar to those obtained on the field sizes ranging from 2.1 to 9.14 (mm). It was built a response curve for number of lesions in the central leaflet and lesion diameter (mm) for different concentrations of conidia or mycelium macerated / mL. Concentrations used were 15×10^3 , 45×10^3 , 60×10^3 conidia / mL and 5×10^3 , 25×10^3 , 50×10^3 100×10^3 mycelium triturated / mL. Concentrations $30-50 \times 10^3$ showed a number of lesions and size of lesions satisfactory and did occurred lesions coalescence in these concentrations. For the reaction of cultivars were used potted

containing four plants with four trifoliolate leaves of BMX PotênciaRR, Hutcheson, M8336RR, M8360RR, M-Soy 8001, NK 7059RR (V-maxRR) and TMG 113RR. We used two strains (IS-01/MG and MES307), four replicates and the experiment was repeated twice. Suspensions with 45×10^3 conidia / ml for strain 01/MG and with 45×10^3 mycelium triturated / ml for strain MES307 were used for inoculation. We evaluated defoliation (%), incidence (%), number of lesions and lesion size (mm). The cultivars that showed more defoliation were M-Soy 8001 and TMG 113RR demonstrating that these cultivars may be more sensitive to the toxin production of *C. cassicola*. Those with the highest incidence were the NK 7059RR and Hutcheson cultivars may be an indication that these cultivars showed a hypersensitive response, because even with the highest incidence, showed the lowest defoliation, number of lesions and lesion size. Those who had more injuries were M-Soy 8001 and TMG 113RR indicating that these cultivars are more susceptible to penetration of the pathogen. The largest lesion size (mm) were found to BMX PotênciaRR and M-Soy 8001 demonstrating that these cultivars are more susceptible to colonization of the pathogen.

Keywords: Inoculum concentration, *Glycine max*, cultivar reaction

1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill], é uma planta herbácea pertencente à família das Fabáceas. Os cultivares comerciais são anuais e suas variedades podem ser classificadas quanto à duração do

ciclo vegetativo em: precoces, semiprecoces e tardias ou mesmo em grupos de maturação (BORÉM,1999).

O fungo *Corynespora cassiicola* (WEI, 1950) foi relatado causando doenças em mais de 70 espécies de plantas hospedeiras distribuídas em diversos países de clima tropical e subtropical (Silva *et al.*, 1995). Os sintomas nas folhas inicialmente se caracterizam por pequenos pontos de coloração castanha-avermelhada a parda. Com a evolução da doença este pontos evoluem para manchas de formato arredondado ou irregular da mesma coloração variando em tamanho de 10 a 15 mm. Muitas vezes as lesões quando completamente desenvolvidas apresentam anéis concêntricos de tecidos mortos circundados por um halo de coloração verde amarelado muito similar a um alvo, por isso o nome comum da doença de mancha alvo. (Almeida *et. al.* 2005; Hartman *et al.* 1999).

Umidade relativa do ar igual ou superior a 80%, precipitações pluviais acima de 800 mm no ciclo da cultura da soja, favorecem a doença enquanto que o déficit hídrico inibe o crescimento do fungo e desenvolvimento da doença (SNOW & BERGGREN, 1989; FUNDACRUZ, 2006). Almeida e Yamashita (1978), realizando inoculação de *C. cassiicola* em plantas de soja, verificaram que a incubação das plantas pós-inoculação por período de 48 horas em câmara úmida, promoveu a melhor infecção quando comparado com incubações de 12 e 24 horas.

Almeida & Yamashita (1978), estudaram o efeito da concentração de inóculo na reprodução de sintomas da doença em cultivares de soja. Estes autores, utilizando as concentrações de 25×10^3 , 50×10^3 e 100×10^3 conídios/mL de suspensão, concluíram que

a concentração de 50×10^3 conídios/mL foi a que melhores resultados apresentou, sendo que na concentração de 100×10^3 conídios/mL houve coalescência das lesões, o que dificultou as avaliações. Roim (2001), utilizou em seu trabalho micélio triturado em liquidificador não havendo um estudo da relação entre o número de estruturas infectivas na reprodução dos sintomas. Muliterno de Melo (2009), estudou o efeito da concentração de conídios/mL de suspensão sobre o número de lesões por folíolo central e também sobre o diâmetro das lesões. A autora utilizou as concentrações de 0, 5×10^3 , 15×10^3 , 25×10^3 , 35×10^3 e 45×10^3 conídios/mL, concluindo que a concentração de 35×10^3 conídios/mL foi suficiente para avaliar diferentes cultivares de soja, não ocorrendo o coalescimento das manchas foliares.

O objetivo do trabalho foi determinar o método de inoculação, concentração de inóculo, aplicação de análise de imagens em avaliação da doença e estudar a reação de cultivares de soja a partir da aplicação destes métodos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fitopatologia / Micologia da Universidade de Passo Fundo (UPF) no período de 24 meses compreendidos nos anos de 2010 e 2011.

2.1 Isolados

Foram utilizados três isolados de *C. cassicola* oriundos de diferentes regiões brasileiras (Tabela 1). Os isolados 01/MG cedido

gentilmente por Avozani (2011). O isolado MES307 foi cedido pela Embrapa Soja (Centro Nacional de Pesquisa Soja). O isolado 25/MT foi obtido no presente trabalho conforme descrito anteriormente no Capítulo I.

Tabela 1 - Identificação e procedência dos isolados de *Corynespora cassicola*. Passo Fundo, RS. 2012.

Isolado	Tecido	Local	Fonte
01/MG	Folha	Uberlândia/MG	Avozani (2011)
25/MT	Folha	Lucas do Rio Verde/MT	Deste estudo
MES307	Folha	Pitanga/PR	Embrapa Soja (1996)

2.2 Plantas

Os cultivares (Tabela 2) foram semeados em vasos plásticos contendo 500 gramas de solo suplementado com cama de aviário. As sementes foram previamente tratadas com Maxim XL na dose de 100 mL/100 Kg de sementes e semeadas na quantidade de 10 por vaso. Após a completa emergência realizou-se o desbaste quando necessário, mantendo-se quatro plântulas por vaso. Foram utilizados quatro vasos por tratamento. As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento sob temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Foi realizada uma adubação via água de irrigação nas plantas quando as mesmas se encontravam com um trifólio completamente

desenvolvido (estádio fenológico V2), através do uso de 100 g/5 L de água do fertilizante Kristalon.

2.3 Produção de inóculo

Os três isolados de *C. cassicola* (Tabela 1) foram transferidos para placas de Petri contendo meio alimento infantil (AI), a partir de tubos com suas culturas puras mantidas em refrigerador a 4°C (micoteca do laboratório). As placas foram envoltas com filme plástico e levadas para câmara de crescimento sob temperatura de 25°C ± 2, fotoperíodo de 12 horas. Na câmara foram dispostas em prateleiras com três lâmpadas fluorescentes de 40 W de potência localizadas a 50 cm acima das placas por um período de 15 dias. Para a obtenção das concentrações desejadas para cada experimento, 10 mL de água destilada e autoclavada foi adicionado às placas contendo a cultura pura de cada isolado. Com o auxílio de um pincel de camelo n° 20, os conídios ou fragmentos de micélio foram raspados para comporem a suspensão de inóculo. Quando o isolado não apresentou esporulação suficiente, todo o micélio foi raspado e triturado em liquidificador. Para a calibração do inóculo, três amostras de cada suspensão, de 10 µL foram pipetadas e dispensadas em lâminas para a varredura e contagem no microscópio óptico visando conhecer a concentração de conídios ou fragmentos de micélio triturado por mL.

Tabela 2 - Cultivares comerciais de soja utilizados no trabalho proposto.

Cultivar	Tipo	Obtentor	Reação à mancha alvo⁽¹⁾
M8336RR	O.G.M ⁽³⁾	Monsanto	Suscetível
M-Soy 8001	Convencional	Monsanto	Suscetível
M8360RR	O.G.M ⁽³⁾	Monsanto	Moderadamente Suscetível
BMX Potência RR	O.G.M ⁽³⁾	Brasmax Genética	Sem informação
TMG113RR	O.G.M ⁽³⁾	T.M.G. (Fundação Mato Grosso)	Suscetível
NK 7059RR (V-maxRR)	O.G.M ⁽³⁾	Syngenta seeds	Moderadamente resistente ⁽²⁾
Hutcheson	Convencional	Estação experimental em Agricultura da Virginia, USA, 1983	Sem informação

⁽¹⁾Reação fornecida por cada empresa em seus meios de divulgação ao produtor; ⁽²⁾Moderadamente resistente, porém a empresa informa a reação ao complexo de doenças conhecido com doenças de final de ciclo; ⁽³⁾ cultivares de soja tolerantes ao herbicida glifosato.

2.4 Métodos

Foram comparadas quatro metodologias para escolha da que melhor reproduzisse os sintomas obtidos à campo: M-1) Foram

inoculadas suspensões do isolado 25/MT através de pulverização manual, na concentração de 45×10^3 conídios/mL às 19:00 horas da noite, visando eliminar a exposição do inóculo aos raios solares. As plantas do cultivar M8336RR se encontravam no estágio R1 (início do florescimento) à campo e foram inoculadas até a cobertura completa de seus folíolos com a suspensão; M-2) inoculação de uma suspensão do isolado 25/MT na concentração de 45×10^3 conídios/mL através de pulverização manual realizada até a completa cobertura dos folíolos das plantas do cultivar M8336RR. As plantas do cultivar se apresentavam no estágio fenológico V4 (três trifólios completamente desenvolvidos). Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 48 horas; M-3) M-2 associado ao molhamento foliar noturno proporcionado por um conjunto de micro-aspersores, bomba de 1/2 cv e um temporizador digital regulado de modo que de 4 em 4 horas durante o período noturno, o conjunto fosse ligado por um minuto, proporcionando um molhamento foliar noturno contínuo; M-4) Foram coletados trifólios do cultivar M8336RR quando o mesmo se apresentava no estágio fenológico V4. Os trifólios foram imediatamente colocados em caixas plásticas contendo água destilada visando eliminar a entrada de ar pelos seus pecíolos. Para o cultivo das folhas destacadas, foram utilizadas caixas de acrílico, tipo gerbox (11 x 11 x 3,5 cm de altura), contendo uma espuma de nylon, duas folhas sobrepostas de papel filtro e umedecidos com solução nutritiva. Os folíolos foram inseridos pelo pecíolo em um pequeno furo da espuma de nylon até que o mesmo entrasse em contato com a solução nutritiva. O material foi inoculado com suspensão do isolado 25/MT na concentração de 45×10^3 conídios/mL através de pulverização

manual realizada até a completa cobertura dos folíolos e os gerboxes foram fechados com filme plástico. Após esta etapa, os conjuntos foram levados para câmara de crescimento sob temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$, fotoperíodo de 12 horas. Na câmara foram dispostos em prateleiras com três lâmpadas fluorescentes de 40 W de potência localizadas a 50 cm dos gerboxes. Após 20 dias foi realizada a avaliação do tamanho da lesão (mm) para todos os métodos utilizados.

2.5 Avaliações

Após 20 dias da inoculação, as plantas foram avaliadas através do programa APS Asses 2.0 (LAMARI, 2008), onde os folíolos centrais foram digitalizados através de impressora multifuncional HP Deskjet F4400 series. As fotos foram digitalizadas na resolução de 300 dpi. Após a coleta das imagens, estas foram submetidas à avaliação pelo software APS Assess 2.0. Os dados foram exportados para uma planilha em excel para análise. Inicialmente foram comparados os dados obtidos para tamanho de lesão (mm) obtidos pelo paquímetro digital e pela digitalização de imagens com posterior análise pelo software, visando conhecer a correlação ou acuracidade entre os dados obtidos por ambos os métodos.

2.6 Curvas de concentração

Para a obtenção das curvas de respostas à concentração de inóculo, foram utilizados os isolados 25/MT e MES307 (Tabela 1). O isolado 25/MT se mostrou esporulante *in vitro*. A sua concentração foi

calibrada e expressa em conídios/mL. Foram utilizadas as concentrações de 15×10^3 , 45×10^3 , 60×10^3 conídios / mL e o cultivar M8336RR. O isolado MES307 não apresentou esporulação significativa *in vitro*, portanto a sua concentração foi calibrada e expressa em número de fragmentos de micélio/mL. Foram utilizadas as concentrações de 5×10^3 , 25×10^3 , 50×10^3 e 100×10^3 fragmentos de micélio triturado / mL e o cultivar BMX Potência RR. Foi construído uma curva de resposta para número de lesões no folíolo central e diâmetro das lesões (mm) em função de diferentes concentrações de conídios ou micélio triturado / mL de suspensão. A metodologia foi similar à descrita pelos autores Almeida & Yamashita (1978) e Muliterno de Melo (2009).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão visando encontrar um modelo matemático que explicasse esta relação e estabelecer a concentração que melhor reproduza os sintomas da doença e com a menor variação possível entre as repetições e sem coalescência das lesões.

2.7 Reação de cultivares

Foram utilizados dois isolados 01/MG e MES307 (Tabela 1). O cultivo das plantas e a calibração do inóculo foram descritos anteriormente. Os cultivares utilizados estão descritos na Tabela 2. Foi utilizado 45×10^3 conídios/mL de suspensão para o isolado 01/MG e 45×10^3 fragmentos de micélio triturado/mL para o isolado MES307. Juntamente com a suspensão foram adicionadas duas gotas do espalhante adesivo Energic. As plantas se apresentavam no estágio V4

(três trifólios completamente desenvolvidos). O método utilizado foi o M-3, ou seja inoculação da suspensão através de pulverização manual realizada até a completa cobertura dos folíolos das plantas dos cultivares. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 48 horas e após este período foi mantido o molhamento foliar noturno por meio de um conjunto de micro-aspersores, bomba de 1/2 cv e um temporizador digital regulado de modo que de 4 em 4 horas durante o período noturno, o conjunto foi ligado por um minuto, e proporcionou um molhamento foliar noturno contínuo. Após 20 dias, foram realizadas as avaliações.

Para a avaliação, foi utilizada uma combinação de métodos patométricos. Foram utilizados quatro trifólios como sub-amostras componentes de cada repetição de cada experimento. Foi avaliado o percentual de desfolha (DF), representado pelo número de nós da planta sem trifólio em relação ao número total de trifólios, incidência (IN) representada pelo número de trifólios com sintomas em relação ao número total de trifólios, número de lesões no trifólio central (NL) e o tamanho médio das lesões em milímetros (TL). Todas as mensurações do tamanho das lesões e número das lesões foram realizadas com o programa APS Asses 2.0 (LAMARI, 2008)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os dados da Tabela 3, pode-se destacar que os menores valores encontrados para tamanho da lesão (mm) foi para o método 2, ou seja aquele mais utilizado na literatura, o que coincide com os dados obtidos por diversos autores (MULITERNO DE MELO,

2009; SPENCER & WALTERS, 1969; ONESIROSAN et al.,1974). Os métodos 3 e 4 apresentaram tamanho de lesões similares aos encontrados no método 1 não havendo diferenças estatísticas entre os mesmos, ou seja se aproximam-se dos valores obtidos no campo para a mancha-alvo. Para estes dois métodos o tamanho das lesões variaram de 2,0 a 14,30 e se assemelham aos dados obtidos por Avozani (2011). Em relação ao método 4, pode ser vantajoso para uma avaliação de um grande número de cultivares ou linhagens dentro de um programa de melhoramento. Este método também demanda um menor espaço físico do que os anteriores haja visto que é necessário apenas um gerbox (11 x 11 x 3,5 cm de altura), contendo uma espuma de nylon, duas folhas sobrepostas de papel filtro, solução nutritiva e um folíolo do cultivar ou linhagem em estudo.

A principal vantagem do método 3, em relação ao 4, é a possibilidade de avaliar outros fatores nas plantas como desfolha, o que não é possível utilizando folhas destacadas. Este método pode ser utilizado em programas de melhoramento em fases mais avançadas dos mesmos, onde há um pequeno número de materiais em último ano de teste ou ensaio de VCU (recomendação do cultivar).

Tabela 3 – Tamanho da lesão (mm) em função do método de inoculação com o isolado 25/MT em cultivar M8336RR.

Tamanho da lesão (mm)			
Método	Mínimo (mm)	Máximo (mm)	Média
M-1	2,10	9,14	4,57 a
M-2	1,79	5,92	3,28 b
M-3	2,15	11,06	5,35 a
M-4	2,00	14,30	4,92 a

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.

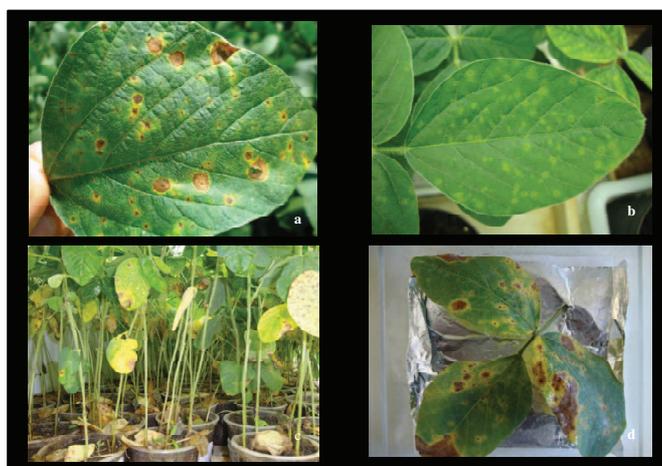


Figura 1 – Comparação dos métodos: a) M-1, b) M-2, c) M-3 e d) M-4.

Também foram comparados os métodos de avaliação para tamanho de lesão (mm) através do paquímetro digital e com base na

análise de imagens pelo software Assess 2.0 (Figuras 2, 3 e 4). Na Figura 5 pode ser constatado que os valores para tamanho de lesão (mm) obtidos pelo software Assess 2.0 e pelo paquímetro digital se correlacionam com R^2 igual a 0.9837. Este valor é alto, sugerindo que o software pode ser utilizado com precisão nas análises.

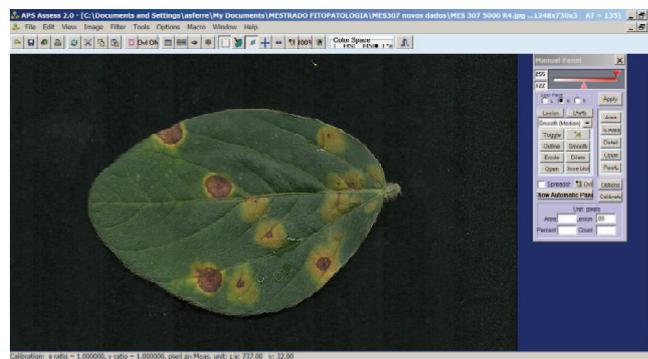


Figura 2 - Imagem do folíolo central apresentando sintomas da mancha-alvo da soja.

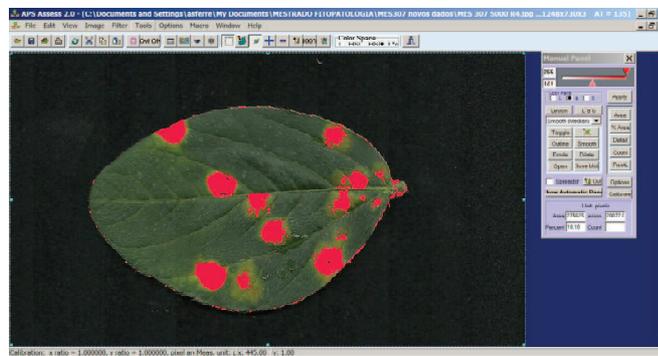


Figura 3 - Imagem do folíolo central apresentando sintomas da mancha-alvo da soja. Tratamento da imagem para coleta dos dados.

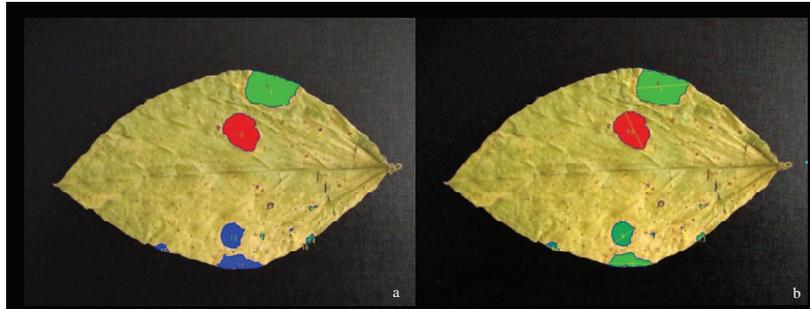


Figura 4 - Análise das imagens pelo programa ASSESS 2.0 a) contagem das lesões; b) mensuração do diâmetro das lesões em mm.

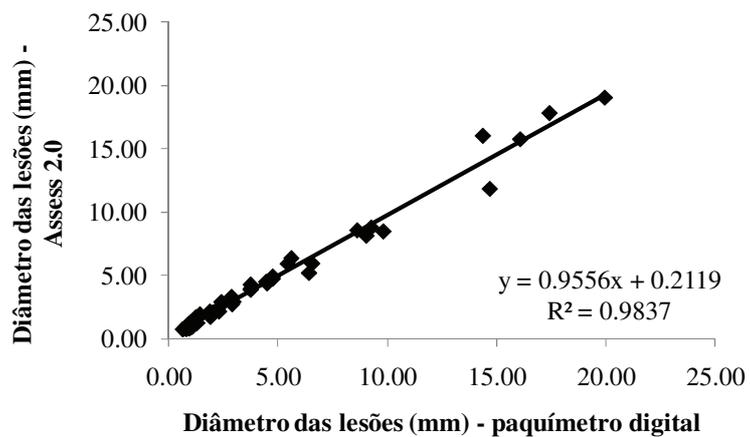


Figura 5 - Comparação dos dados de tamanho de lesão (mm) obtidos pelo programa Assess 2.0 e paquímetro digital.

Nos estudos da relação entre a concentração de inóculo e sintomas, a concentração de 45×10^3 conídios/mL o desvio padrão foi

de $\pm 2,15$ lesões por folíolo central enquanto que a concentração de 60×10^3 apresentou um desvio padrão de $\pm 3,27$ lesões por folíolo central. Para a concentração de 50×10^3 fragmentos de micélio triturado/mL foi obtido um desvio padrão de $\pm 5,19$ lesões por folíolo central, enquanto que para 100×10^3 fragmentos de micélio triturado/mL foi obtido um desvio padrão de $\pm 6,51$ lesões por folíolo central. Estes valores demonstram que para o número de lesões por folíolo central deve ser utilizado uma concentração de $45-50 \times 10^3$ conídios ou fragmentos de micélio triturados/mL reduzindo a variação dos dados e também a coalescência das lesões (Figuras 2 e 3). Para tamanho de lesão (mm) conforme houve um aumento na concentração do inóculo, houve uma redução no desvio padrão dos dados. Este fato ocorre porque com o aumento da concentração de inóculo, ocorre um aumento no número de lesões e diminuição do seu tamanho, pois elas acabam competindo entre si por tecido suscetível (Figuras 4 e 5). Portanto, concentrações de $45-50 \times 10^3$ conídios ou fragmentos de micélios/mL podem ser utilizadas em estudos visando conhecer a reação de cultivares de soja à mancha-alvo. Estes valores são similares aos descritos por Almeida & Yamashita (1978) e Muliterno de Melo (2009).

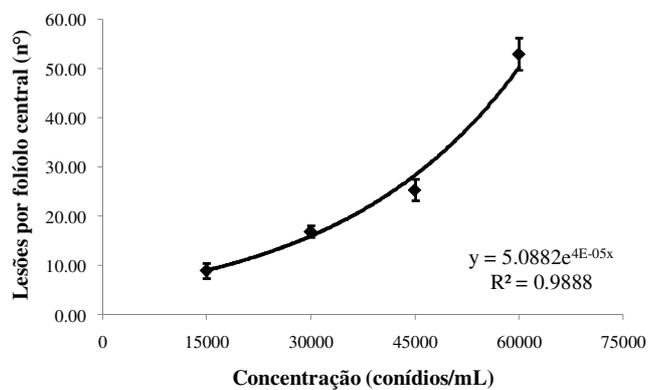


Figura 6 - Efeito da concentração de inóculo do isolado 25/MT sobre o número de lesões por folíolo central do cultivar M8336RR.

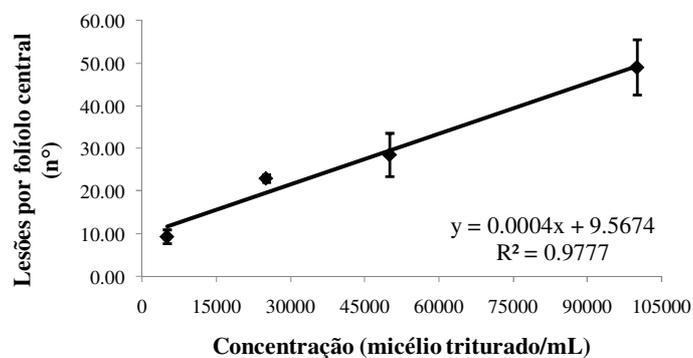


Figura 7 - Efeito da concentração de inóculo do isolado MES 307 sobre o número de lesões por folíolo central do cultivar BMX Potência RR.

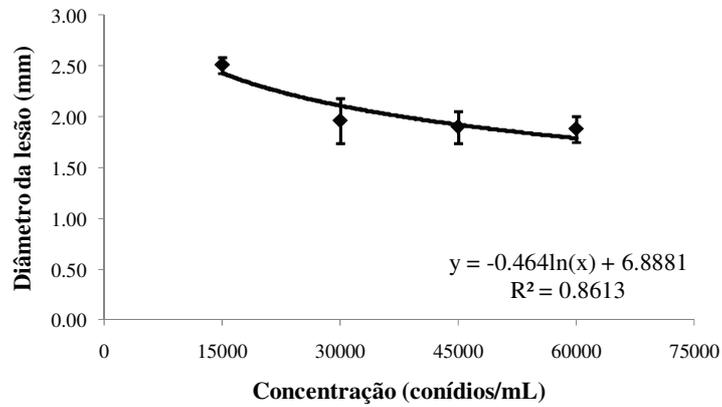


Figura 8 - Efeito da concentração de inóculo do isolado 25/MT sobre o diâmetro das lesões no folíolo central do cultivar M8336RR.

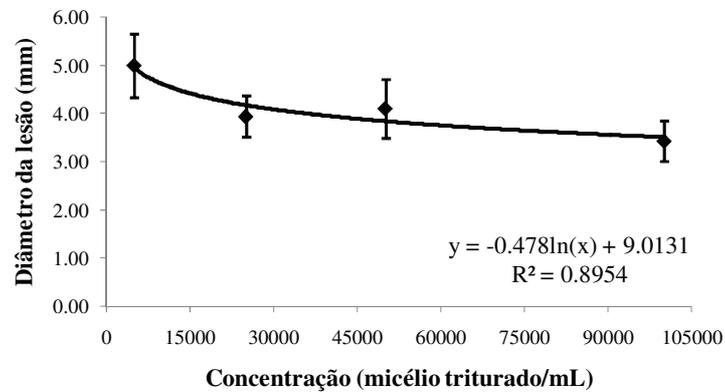


Figura 9- Efeito da concentração de inóculo do isolado MES307 sobre o diâmetro das lesões no folíolo central do cultivar BMX PotênciaRR.

De acordo com os dados da Tabela 5, podemos destacar que nenhum dos sete cultivares testados foram imunes.

Quanto ao percentual de desfolha, os cultivares mais suscetíveis foram M-Soy 8001 e TMG 113RR. A desfolha (%) é um componente importante da doença à campo, porém não foi encontrado em literatura trabalhos em condições controladas estudando este componente para a doença mancha alvo da soja.

Os cultivares que apresentaram maior incidência foram NK 7059RR (V-maxRR) e Hutcheson. No cultivar Hutcheson, mesmo apresentando alta incidência da doença, os tamanhos das lesões foram menores o que pode ser um indicativo de reação de resistência à doença.

Para o número de lesões, foi observado o maior número de lesões para os cultivares M-Soy 8001 e TMG 113RR, demonstrando que estes cultivares não possuem mecanismos de resistência à penetração do patógeno. Muliterno de Melo (2009), também encontrou cultivares mais suscetíveis à penetração deste patógeno.

Os maiores diâmetros de lesão (mm) foram encontrados para BMX PotênciaRR e M-Soy 8001 indicando que estes cultivares são mais suscetíveis aos mecanismos de colonização do patógeno. Resultados similares, utilizando outros cultivares, foram encontrados e discutidos por Muliterno de Melo (2009).

Tabela 5 – Reação de cultivares de soja a dois isolados de *Corynespora cassiicola*. Passo Fundo, RS. 2012

Isolados	Fatores	Cultivares							CV%
		VAR1	VAR2	VAR3	VAR4	VAR5	VAR6	VAR7	
IS01/MG	DF (%)	50,5 aB	0,0 aD	50,8 bB	32,1 aC	68,6 aA	29,2 bC	50,0 bB	16,3
MES307		58,3 aBC	0,0 aE	66,7 aAB	32,3 aD	71,9 aA	56,3 aC	70,8 aA	
IS01/MG	IN (%)	51,6 aC	66,7 aB	50,0 aC	71,9 aA	50,0 aC	63,9 bB	51,9 aC	22,1
MES307		57,1 aB	100,0 aA	33,3 aC	63,7 bB	25,0 aC	90,6 aA	29,2 bC	
IS01/MG	NL (n°)	20,0 bD	20,1 bD	125,0 aA	46,2 aC	50,1 bC	44,3 aC	119,2 bB	34,0
MES307		63,4 aD	80,7 aC	90,1 bB	16,0 bF	137,3 aA	26,0 bE	140,4 aA	
IS01/MG	TL (mm)	4,4 bB	2,5 aF	5,5 aA	3,2 aDE	3,6 bCD	2,8 aEF	4,1 aBC	22,5
MES307		6,6 aA	1,7 bD	4,7 bB	1,7 bD	6,6 aA	3,0 aC	4,7 aB	

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. Sendo VAR1: BMX PotênciaRR, VAR2: Hutcheson, VAR3: M8336RR, VAR4: M8360RR, VAR5: M-Soy8001, VAR6: NK7059RR (V-MaxRR), VAR7: TMG113RR, DF(%): Percentual de desfolha, IN(%): Incidência trifoliolar, NL(n°): Número de lesões, TL(mm): Tamanho da lesão em mm.



Figura 10 - Reação do cultivar Hutcheson inoculada com o isolado MES307. a) vista da unidade experimental; b) trifólio com detalhe da reação.



Figura 11 - Reação do cultivar BMX PotênciaRR inoculada com o isolado MES307. a) vista da unidade experimental; b) trifólio com detalhe da reação.



Figura 12 - Reação do cultivar TMG 113RR inoculada com o isolado MES307. a) vista da unidade experimental; b) trifólio com detalhe da reação.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos três (inoculação com período pós inoculação de 48 horas em câmara úmida associada com molhamento foliar noturno mantido, simulando as condições de orvalho à campo) e quatro (folha destacada) possibilitaram uma melhor reprodução dos sintomas podendo ser utilizados para estudo de reação de cultivares.

A doença depende de molhamento pós-inoculação e pós-período latente para sua evolução.

As concentrações de 45×10^3 conídios/mL ou 50×10^3 micélio triturado/mL podem ser utilizadas para a avaliação de cultivares de soja quanto à reação a mancha alvo.

Os cultivares M-Soy 8001 e TMG113RR, apresentaram maiores percentuais de desfolha e tamanho de lesão (mm), podendo ser utilizados como padrões de suscetibilidade à mancha-alvo. Os cultivares Hutcheson e NK7059RR, apresentaram maiores incidências, menores tamanhos de lesão (mm) e menores percentuais de desfolha indicando que os mesmos podem ser utilizados como padrões de resistência.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. *Plant pathology*. 5ª edição. Califórnia: editora Elsevier Academic Press, 2005 948 p.

ALMEIDA, A. M. R.; YAMASHITA, J. Crescimento e esporulação de *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt) Wei em diferentes meio de cultura. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, vol. nº1, p.203-206, 1976.

ALMEIDA, A. M. R.; MACHADO, C. C.; FERREIRA, L. P.; LEHMAN, P. S.; ANTONIO, HELENITA. Ocorrência de *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei no estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira*. v.1, p. 111-112, 1976.

ALMEIDA, A. M. R. Influência do pH sobre crescimento e esporulação de *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei em meio de batata dextrose agar em diferentes períodos de incubação. *Fitopatologia Brasileira*. v. 2, p. 175-177, 1977.

ALMEIDA, A. M. R.; YAMASHITA, J. Efeito da técnica de inoculação de *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei na reação de três cultivares de soja. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, vol. nº3, p.55-58, 1978.

ALMEIDA, A. M. R. et. al. Doenças da soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. *Manual de Fitopatologia*, v. 2, 4ª edição, 2005, p. 569-588.

ANNAKUTTY, J. Investigation on certain biochemical changes and phyllosphere microflora on *Hevea brasiliensis* as influenced by nitrogenous fertilizer application and *Corynespora cassiicola* inoculation. 1998. Tese (Doutorado em micologia e patologia de plantas) Rubber research institute of India, India, 1998.

AVALHAES, T. A.; MACHADO, A. Q.; CASSETARI, D.; MELLO, A. C. T.; MOURA, T. A; PINHO, R. A. Controle químico de mancha alvo em soja em Mato Grosso. *Tropical Plant Pathology*, Cuiabá, v. 35, p.115, 2010. Suplemento.

AVOZANI, A. Sensibilidade de *Corynespora cassicola*, isolados de soja, a fungicidas *in viro*. 2011. 135 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Fitopatologia Passo Fundo) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2011.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Mineapolis, Minessotta, 3ª edição, 1972.

BERKELEY, M. J. On collection of fungi from Cuba Part II., *Journal. Linn. Soc. Bot.*, v. 10., p. 341-392, 1869.

BORÉM, A. Escape gênico: os riscos do escape gênico da soja no Brasil. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 10: 101-107, 1999.

CARREGAL, L.H.; CAMPOS, H.D.; SILVA, J.C. Fortalecida e agressiva. *Revista cultivar*, n.14, p.20-22, 2008.

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 2012: Levantamento de safra – Maio de 2012. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 17 de maio de 2012.

COOKE, M. C. New melon disease. *Gdnrs.' Chron.*, v. 3, n.20, p. 271-272, 1986.

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.

ELLIS, M.B. Some species of *Corynespora*. *Mycological papers*, v. 9, n. 65, p. 1-15, 1957.

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

EMBRAPA. *Tecnologias de produção da soja. Tecnologias de produção de Soja Região Central do Brasil*. Versão eletrônica. Embrapa, 2003.

EMBRAPA. *Sistema de produção. Tecnologia de Produção de Soja da Região Central do Brasil*. Londrina PR, 2007, 225 p.

FERNANDES, M.R., *Manual para Laboratório de Fitopatologia*. Passo Fundo: EMBRAPA CNPT, 1993. (EMBRAPA-CNPT. Documentos, 6).

FUNDACRUZ. *Manual de difusión técnica de soja*. 5ª edição, Bolivia: Santa Cruz, p. 84-102, 2006.

GOODMAN, R. N.; KIRALY, Z.; ZAITLIN, M. *The biochemistry and Physiology of infectious plant disease*. Princeton: editor: D. Van Nostrand Company, Inc, 1967.

GÜSSOW, H. T. Ueber eine neue Krankheit an Gurken in England (*Corynespora Mazei*, Güssow gen. et spec. nov.). *Z. Pflkrankh*, v.16, p. 10-13, 1906.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, v. 67, p. 597 - 607, 1975.

HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J.C. *Compendium of Soybean Diseases*. 4ª edição. Minnesota: editora APS Press, p.27, 1999.

HARTWIG, E. E. Effect of target spot on yield of soybeans. *Plant Disease Reporter*, v. 43 n. 4, 1959.

KAWAMURA, E. On the causal fungus of ring spot of cowpea (*Cercospora vignicola* n. sp.). *Fungi Nippon Fungological Society*, v.1, p. 14-20, 1931.

KOENNING, S. R.; CRESWELL, T. C. Increased occurrence of target spot of soybean caused by *Corynespora cassiicola* in southeastern United States. *Plant Disease*, v. 90 p. 974, 2006.

LAMARI, L. Assess 2.0 image analysis software for disease quantification. *The American Phytopathological Society*, Sain Paul, Minnessota, 125 p., 2008.

MALVICK, D. K. Fungus foliage diseases of soybeans. *Report on Plant Disease*. p. 1-9, 2004.

MAY-DE-MIO, L. L.; AMORIM, L. Influência da temperatura e da duração do molhamento foilar nos componentes monocíclicos da ferrugem do álamo. *Summa Phytopathologica*, v. 28, p.33-39, 2002.

MULITERNO de MELO, M. Produção de esporos e inoculação de *Corynespora cassiicola* em soja. 2009. 76 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Fitopatologia Passo Fundo) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2009.

MUNSELL SOIL COLOR COMPANY. *Munsell soil color charts*, Baltimore, 1975.

NGHIA, N. A.; KADIR, J.; SUNDERASAN, E.; ABDULLAH, M. P.; MALIK, A.; NAPIS, S. Morphological and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers Analyses of *Corynespora cassiicola* Isolates from Rubber Plantations in Malaysia. *Mycopathologia* 166:189–201, 2008.

NITURE, S. K.; PANT, A. Production of cell wall-degradation enzymes by a pH tolerant estaurine fungal isolate *Fusarium monilifome* NCIM1276 in different culture conditions. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 23, p. 1169 - 1177, 2007.

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

OLIVEIRA, R. R.; VIDA, J. B.; TESSMANN, D. J.; AGUIAR, B. M.; CAIXETA, M. P.; BARBOZA, A. L. Patogenicidade de isolados de *Corynespora cassiicola* a diferentes espécies de plantas. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 33, n. 3, p. 297-299, 2007.

ONESIROSAN, P. T.; ARNY, D. C.; DURBIN, R. D. Host specificity of Nigerian and north American isolates of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology*, n. 64, p. 1364 – 1367, 1974.

PATERSON, R. R. M.; BRIDGE, P. D. *Biochemical techniques for filamentous fungi*. Cambridge: CAB international, 1994.

PEREIRA, J. M.; BARRETO, R. W.; ELLISON, C. A.; MAFFIA, L. A. *Corynespora cassiicola* f. sp. *lantanae*: a potential biocontrol agent from Brazil for Lantana câmara. *Biological Control*. 26: 21-31, 2003.

REIS, E. M.; BRUSTOLIN, R.; ZANATTA, T.; SCHEER, O.; BLUM, M. M. C. Relação entre a severidade e incidência foliar de oídio causado por *Microsphaera diffusa*, em soja. *Fitopatologia Brasileira* 29 (Suplemento), v. 75, 2004.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; BRESOLIN, A. C. R. Técnicas de amostragem de lavouras e determinações patométricas *In*: REIS, E. M. et al. Critérios indicadores do momento de aplicação de fungicidas visando o controle de doenças em soja e trigo. Editora Aldeia Norte, 2009, p. 79-90.

REIS, E. M.; REIS, A. C.; CARMONA, M. A. *Manual de fungicidas – Guia para o Controle Químico de Doenças de plantas*. 6 ed. Passo Fundo: Editora UPF, 2010. 226 p.

RINZO, S.; KITAZAWA, K. Occurrence of soybean root rot caused by *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei in Hokkaido. *Annual Phytopathology Society Japan*, n. 46, p. 193-199, 1980.

ROIM, F. F. B. *Morfologia e patologia de isolados de Corynespora cassiicola obtidos de mancha foliar (mancha-alvo) e podridão radicular da soja*. 2001. 77 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Fitopatologia Jaboticabal) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2001.

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

SILVA, W. P. K.; MULTANI, D. S.; DEVERALL, B. J.; LYON, B. R. RFLP and RAPD analyses in the identification and differentiation of isolates of the leaf spot fungus *Corynespora cassiicola*. *Australian Journal of Botany* v. 43, p. 609-618, 1995.

SILVA, J. F. V. et. al. Contribuição ao desenvolvimento de linhagens de soja com resistência à patógenos. Boletim de pesquisa e desenvolvimento 1. Londrina PR, 2002. p. 1-43.

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

SOARES, R. M; GODOY, C. V.; OLIVEIRA, M. C. N. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha alva da soja. *Tropical Plant Pathology*. v. 34, 333-338, 2009

SPENCER, J. A.; WALTERS, H. J. Variations in certain isolates of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology*, v. 59, p. 58-60, 1969.

THORMANN, M. N.; CURRA, R.S.; BAYLEY, S.E. The relative ability of fungi from *Sphagnum fuscum* to decompose selected carbon substrates. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 48, p. 204-211, 2000.

TUITE, J. *Plant Pathological Methods*. Fungi and Bacteria. Minneapolis: Burgers Publishing Co. 1969. 239 p.

VAN der PLANK, J. E. *Disease resistance in plants*. New York and London: Academic Press, 1968.

VEIGA, P. Mancha alva: Uma nova doença da soja no Rio Grande do Sul. *Rev. Centro Ciências Rurais*, v. 8, n. 1, p. 79-82, 1978.

WEI, C. T. Notes on *Corynespora*. *Mycological Papers*. v. 30, n. 34, p.1 – 10, 1950.

YORINORI, J. T., HOMECHIN, M. Doenças de soja identificadas no estado do Paraná no período de 1971 a 1976. *Fitopatologia Brasileira*, v.2, n.1, p.108, 1977.

YORINORI, J. T. Levantamento e avaliação da situação de doenças na safra 1986/87. In: *Resultados de Pesquisa de soja 1986/87*. Londrina, Embrapa – CNPSo, 1988, p.158.

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, p.158. 1989.

YORINORI, J. T. Epidemia de mancha alva (*Corynespora cassiicola*) na cultivar FT-Estrela na safra 1996/97. In: *XVIII Reunião de Pesquisa 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*, Londrina, Embrapa – CNPSo, 1997, p.83.

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