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

Cercospora sojina: PRODUÇÃO DE ESPOROS, DENSIDADE DE INÓCULO E REAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA

DIANA ERICA GÓMEZ

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

Passo Fundo, maio de 2011.

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

Cercospora sojina: PRODUÇÃO DE ESPOROS, DENSIDADE DE INÓCULO E REAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA

DIANA ERICA GÓMEZ

Orientador: Prof. Dr. Erlei Melo Reis

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

Passo Fundo, maio de 2011.

CIP – Catalogação na publicação

F811a Gómez, Diana Érica
Cercospora sojina : produção de esporos, densidade de inóculo de reação de cultivares de soja / Diana Érica Gómez. – 2011.
94 f. : il. ; 25 cm.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, 2011.
Orientação: Prof. Dr. Erlei Melo Reis.

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

CDU: 633.34

Bibliotecária responsável Angela Saadi Machado - CRB 10/1857

Um dia, as sementes de nossos sonhos se transformaram em árvores e espalharam seus ramos...

... e cruzaram o céu unindo numa única linha nosso passado e nosso futuro.

Não há nada que temer...

...uma sabedoria interior as acompanha,

porque cada semente sabe...

...como chegar a ser árvore.

Jorge Bucay

Agradecimentos

A Deus e a Maria Auxiliadora!

Viaja sem pressa, viaja em silêncio, não leves bagagens, confia no Céu.

A meus íntimos!

A Carlos e Nina, pelo apoio permanente na distância, pelas horas de preocupação e pelo amor.

A Jorge, pelo grande apoio, a paciência, a preocupação, e pelas horas de ajuda e dedicação.

Ás autoridades e administrativos:

Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria (INTA), pela oportunidade para crescer no caminho do conhecimento.

Á UPF e ao PPGAgro pela oportunidade de realizar meus estudos.

A meu chefe, o Eng. Agr. Iván Bonacic Kresic, pelo apoio, compreensão e orientação.

Ao diretor da EEA INTA Sáenz Peña, Eng. Agr. Aldo Wutrich, pelo ajuda e compreensão.

Á administração da EEA INTA Sáenz Peña, pela paciência e apoio.

Aos Professores!

Prof. Elei Melo Reis, pela orientação, confiança e por transmitir seus conhecimentos.

Profa. Norimar Denardin, pelo carinho e orientação durante a minha estadia.

Profa. Nadia Langaro, pela confiança e incentivo.

Prof. Carlos A. Forcelini, pelo auxílio nas análises estatísticas e por compartir seus conhecimentos.

Aos funcionários da UPF!

A Mari, Cinara e Paulo, pela informação, a boa predisposição e o auxílio brindado.

A meus amigos e colegas brasileiros!

Andréia, Anderson, Aveline, Camila, Cristina, Elaine, Juliane, Lilian, Marília, Mateus, Rosane, Sandra, Sérgio e Ricardo, pela amizade, a ajuda incondicional, a confiança e pelo carinho.

A meus colegas argentinos!

Em especial aos auxiliares Alicia, Jorgito, Jorge e Omar porque sem sua ajuda não poderia haver concluído os experimentos.

Eng. Agr. Florencia Casse, Lic. Daniel Ojeda e Claudio Vallejos pela compreensão e ajuda com os trabalhos.

Eng. Agr. Alex Montenegro pelo auxílio com os equipamentos.

Eng. Agroindustrial Carlos Derka, pelo auxílio na análise dos dados.

Eng. Agr. Roberto de Rossi pela ajuda na análise estatística.

A todos, obrigada! Com um coração cheio de nomes.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS vii
LISTA DE FIGURAS viii
RESUMO 11
ABSTRACT 13

1 INTRODUÇÃO.....14
2 REVISÃO DE LITERATURA..... 17
2.1 Ocorrência..... 17
2.2 Etiologia..... 17
2.3 Sintomatologia..... 18
2.4 Ciclo da doença..... 19
2.5 Variabilidade genética..... 21
2.6 Esporulação e germinação de conídios de *Cercospora sojina in vitro*..... 23
2.7 Controle..... 23

CAPÍTULO I
IDENTIFICAÇÃO DO AGENTE CAUSAL DE MANCHA OLHO-DE-RÃ EM SOJA.....26
Resumo 26
Abstract.....27
Introdução.....28
Material e métodos.....29
Resultados e discussão.....33
Conclusão.....36

CAPÍTULO II
INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO, LUZ, PAPEL DE FILTRO, pH E POTENCIAL OSMÓTICO NA ESPORULAÇÃO DE *Cercospora sojina* 37
Resumo 37
Abstract.....39
Introdução.....40
Material e métodos.....42
Resultados e discussão.....47
Conclusão.....52

CAPÍTULO III
EFEITO DA DENSIDADE DE INÓCULO DE *Cercospora sojina* E DO ADJUVANTE NA INTENSIDADE DA MANCHA-OLHO-DE-RÃ.....53
Resumo 53
Abstract.....54
Introdução.....55
Material e métodos.....56
Resultados e discussão..... 59
Conclusão.....62

CAPÍTULO IV
EFEITO DA TEMPERATURA NA GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE *Cercospora sojina* 63
Resumo 63
Abstract..... 64
Introdução..... 65
Material e métodos..... 67
Resultados e discussão..... 70
Conclusão..... 74

CAPÍTULO V
REAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA.....75
Resumo 75
Abstract.....76
Introdução.....77
Material e métodos.....79
Resultados e discussão.....82
Conclusão..... 84
Considerações finais..... 85

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 86

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
	CAPÍTULO I	
1	Dimensões dos conídios e número de septos de *Cercospora sojina* obtidos em meio de cultura	**35**
2	Dimensões dos conídios e número de septos de *Cercospora sojina* obtidos por diferentes autores	**35**
	CAPÍTULO II	
1	Relação de concentrações de manitol e KCl para os diferentes potenciais osmóticos	**46**
2	Influência de substratos, luz e papel filtro na esporulação de *Cercospora sojina* (nº conídios.cm²)	**47**
	CAPÍTULO V	
1	Classificação dos tipos de reações dos cultivares de soja	**81**
2	Reação de cultivares de soja à inoculação de *Cercospora sojina* em câmara climatizada. INTA Sáenz Peña, Chaco. Argentina. 2010-2011	**82**

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
	CAPITULO II	
1	Efeito do pH na esporulação (conídios $n^o.cm^{-2)}$ de *Cercospora sojina* em meio ágar V-8 e 25°C.	**49**
2	Efeito do potencial osmótico (-MPa) na esporulação (conídios n°.cm^{-2}) de *Cercospora sojina* em meio ágar V-8, com diferentes concentrações de manitol.	**50**
3	Efeito do potencial osmótico (MPa) na esporulação (conídios $n^o.cm^{-2}$) de *Cercospora sojina* em meio ágar V-8, com diferentes concentrações de KCL.	**51**
	CAPITULO III	
1	Efeito da concentração de inóculo (c) de *Cercospora sojina* sobre o número de lesões (NL) em folíolos de soja do cultivar NK Coker 7.5 RR em tratamentos com e sem adjuvante. INTA Sáenz Peña. Argentina. 2010-2011.	**59**
2	Efeito da concentração de inóculo (c) de *Cercospora sojina* sobre o diâmetro (D) de lesões em folíolos de soja do cultivar NK Coker 7.5 RR em tratamentos com e sem adjuvante. INTA Sáenz Peña. Argentina. 2010-2011.	**61**

CAPITULO IV

1	Relação da germinação de conídios de *Cercospora sojina* em função da temperatura, em três tempos de exposição.	**70**
2	Relação da germinação de conídios de *Cercospora sojina* em função do pH.	**72**
3	Relação da germinação de conídios de *Cercospora sojina* em função do potencial osmótico.	**73**

CAPITULO V

1	Escala diagramática para avaliação da reação de cultivares de soja segundo Distéfano et al. (2009) e modificada por Gómez (2011).	**81**

Cercospora sojina: PRODUÇÃO DE ESPOROS, DENSIDADE DE INÓCULO E REAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA

DIANA ERICA GÓMEZ[1] & ERLEI MELO REIS[2]

RESUMO-A doença mancha olho-de-rã causada pelo fungo *Cercospora sojina* Hara, reduz a área foliar fotossintética devido as lesões necróticas e/ou desfolha precoce na cultura de soja [*Glycine max* (L.) Merril]. Na Argentina, as informações sobre as raças presentes e o nível de resistência de algumas variedades locais são limitadas. Apresentou-se com características epidêmicas nas safras 2008/2009 e 2009/2010 nas províncias de Córdoba e Santa Fé em genótipos de ciclos curtos e intermediários. Como o patógeno é disseminado pela semente a longas distâncias, considera-se necessário avaliar permanentemente o nível de resistência dos cultivares. Os objetivos deste estudo foram: caracterizar morfologicamente o agente causal, avaliar o efeito de diferentes substratos na esporulação, presença de luz e escuro, pH e potencial osmótico. Foi avaliado também o efeito da temperatura, pH e potencial osmótico na germinação de conídios e quantificado o efeito de diferentes densidades de inóculo e do uso de adjuvante sobre o número e o diâmetro das lesões. Finalmente, a reação de cultivares de soja ao

[1] Engenheira Agrônoma, mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia e pesquisadora de Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria, INTA Sáenz Peña.

[2] Orientador, Engenheiro Agrônomo, Dr., professor da FAMV/PPGAgro/UPF. erleireis@tpo.com.br

patógeno. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), Rio Grande do Sul, e no Laboratório Regional de Patologia Vegetal da Estação Experimental Agropecuária (EEA) INTA Sáenz Peña, Argentina. Pela prova de patogenicidade, a caracterização morfológica do fungo e pela comparação com as descrições disponíveis na literatura foi confirmado que o fungo isolado trata-se de *C. sojina*. A maior esporulação do fungo ocorre nos meios ágar V-8, ágar farinha de aveia, ágar extrato de semente de soja e BSA com papel de filtro na presença de luz, no pH 6,7 e com potenciais osmóticos próximos a zero. O maior número e diâmetro das lesões foi produzido na ausência de adjuvante com o aumento da concentração de inoculo e com a densidade de inóculo de $1x10^4$ conídios.mL^{-1} quando o adjuvante for utilizado. A germinação de conídios ocorre na faixa de 5- 35°C, sendo a ótima 25°C nos tempos de exposições de 1, 3 e 4 horas, com pH de 5,9 até 6,1 tolerando os máximos níveis de potencial osmótico (-1 Mpa). Os cultivares NK Coker 7.5 RR, NA 8009 RG, Tob 7.800 RR, NA8010 RG, NA 8413 RG e Munasqa RG demonstraram ser resistentes com os métodos usados para avaliar: número de lesões por folíolo, diâmetro das lesões, tipo de reação e severidade estimada. O cultivar NK Coker 7.5 RR foi significativamente diferente quando foi avaliado pelo diâmetro da lesão.

Palavras -chave: *Glycine max*, mancha olho-de-rã, resistência

Cercospora sojina: SPORES PRODUCTION, INOCULUM DENSITY AND REACTION OF SOYBEAN CULTIVARS

DIANA ERICA GÓMEZ[1] & ERLEI MELO REIS[2]

ABSTRACT- The frogeye leaf spot caused by the fungus *Cercospora sojina* Hara reduces foliar photosynthetic area by necrotic ilesions and/or precocious defoliation in the soybean crop [*Glycine max* (L.) Merril]. In Argentine the information on the present races and the grade of resistance of some local varieties is limited. Disease caused epidemic in the 2008/2009 and 2009/2010 growing seasons. It caused intense damage in the provinces of Cordoba and Santa Fe in genotypes of short and intermediate cycles. Because the pathogens are disseminated by seeds to long distances, it is considered necessary to evaluate the resistance grade of cultivars. The objectives of this study were: to characterize morphologically the causal agent, to evaluate the effect of different substrates in the sporulation, presence of light and the dark, pH and osmotic potential. The temperature effect, pH and osmotic potential in the germination of conidia were quantified. Effect of different inoculum densities and adjuvant use on the number and diameter of lesions were also studied. Finally the reaction of soybean cultivars to the pathogen was evaluated. This work was conducted in the Laboratory of Phytopathology of the Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine of the University of Passo Fundo and Laboratory Regional of Vegetal Pathology to Farming Experimental Station (EEA) INTA Sáenz Peña, Chaco, Argentine. By the pathogenicity test, fungus morphologic characterization and by the comparison with

the descriptions available in the literature was confirmed that the isolated fungus is *Cercospora sojina*. The major sporulation of the fungus was in the means V-8 agar, oats flour agar and extract of seeds of soybean agar with filter paper in the presence of light, in pH 6,7 and with osmotic potentials next to zero. The largest lesion number and diameter was produced in the absence of adjuvant with increasing inoculum concentration and the inoculum density of $1x10^4$ conidia mL^{-1} when the adjuvant is used. The germination of conidia happened in the interval of 5-35°C, being optimum 25°C in the exposure times of 1, 3 and 4 h with pH of 5.9 up to 6.1 and tolerating the maximums levels of osmotic potential. The cultivars NKCoker 7.5 RR, NA 8009 RG, Tob 7.800 RR, NA8010 RG, NA 8413 RG and Munasqa RG demonstrated to be resistant with the used methods to evaluate: number of spots by leaf, diameter of spots, type of reaction and considered severity. Cultivar Coker 7,5 RR were significantly different from the rest when it was evaluated by the diameter of spots.

Key words: *Glycine max,* frogeye leaf spot, resistance

1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merril], uma oleaginosa da Família Fabacea é a cultura com maior área cultivada no mundo.

A distribuição geográfica sugere que a origem botânica é Austrália na que foi domesticada na China (HARTMAN et al., 1999). Após, foi introduzida nos Estados Unidos, sendo a Geórgia o primeiro local de produção em 1765 (HYMOWITZ & HARLAN, 1983).

Posteriormente, depois de várias décadas foi introduzida no Brasil e na Argentina.

Da mesma forma que a cultura foi crescendo em área de produção assim também a importância das doenças foi aumentando resultando em danos que variam entre 10-15 % (WRATHER et al., 2001).

Particularmente a doença mancha olho-de-rã, causada pelo fungo *Cercospora sojina* Hara, causa danos de 31% em cultivares suscetíveis, devido principalmente à redução da área foliar fotossintética pela ocorrência de lesões necróticas e/ou desfolha precoce, o que resulta na redução do peso das sementes (AKEM & DASHIELL, 1991).

O Brasil tem uma produção estimada de soja para a safra 2010/2011 de 68,55 milhões de toneladas (CONAB, 2011) e a doença está controlada geneticamente.

Na Argentina, a soja se tornou uma cultura importante com uma rápida expansão na década 1970 e 1980. Atualmente a produtividade é de 2.660 kg/ha, cultivada numa superfície de 18,8 milhões (MAGyP, 2011).

A soja é uma planta sensível ao fotoperíodo sendo dividido em grupos de maturação. Existem no mundo 13 grupos de maturação num grupamento de 000 a X. Na Argentina existem os grupos de maturação III até IX e foram usados para dividir em regiões com base a sua resposta ao fotoperíodo. Por tanto, no país existem cultivares de ciclo curto (ciclo de maturação III, IV e V), cultivados ao sul da região pampeana, intermediários (ciclo V, VI e VII) cultivados

na região pampeana norte e ciclo longo (VII, VIII e IX) na região norte (RECSO, 2010).

Á doença é pouco conhecida neste país e não existe informação sobre as raças presentes e o nível de resistência de algumas variedades locais. Apresentou-se com características epidêmicas nas safras 2008/2009 e 2009/2010 com danos na cultura da soja nas províncias de Córdoba e Santa Fé, principalmente em genótipos de ciclos curtos e intermediários. A doença atingiu severidade de 30-60% da área foliar afetada (CARMONA & SCANDIANI, 2009).

Por outro lado, os grupos de soja de ciclo de maturação longo não foram avaliados cientificamente na região norte do país para a resistência a esta doença, embora não manifestem sintomas provavelmente pelas condições ambientais não favoráveis dessa região. Cultivares de grupos de maturação mais curtos, suscetíveis, são levadas para a região norte transportado o inóculo. No entanto, o cultivar NK Coker 7.5 RR apresentou sintomas mais severos na Província do Chaco em relação aos outros cultivares de ciclos similares, mas sem confirmação cientifica.

Como o fungo é transmitido por sementes e o fluxo de sementes no país e entre países como Brasil e Argentina é grande, considera-se necessário avaliar constantemente o nível de resistência dos cultivares de ciclo de maturação longo na região.

Portanto, é necessário mais pesquisas sobre o patossistema *C. sojina*-soja. Esta investigação é apenas o início de pesquisas que devem ser abordadas sobre o fungo e a doença no país e tem como objetivos obter métodos para a esporulação e inoculação do fungo a

fim de serem utilizados em futuras pesquisas, e caracterizar as reações de cultivares de soja de ciclo longo à *C. sojina*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ocorrência

A mancha foliar olho-de-rã foi reportada pela primeira vez no Japão em 1915 (HARA, 1915). Em 1924 foi introduzida nos Estados Unidos (MELCHERS, 1925). No Brasil foi observada no Estado do Paraná em 1971 (YORINORI, 1971) sendo assinalada no Rio Grande do Sul em 1973 (REIS & KIMATI, 1973).

Na Argentina, foi encontrada em Tucumán, na safra 1997/1998 em plantas isoladas com uma severidade menor do que 1%, generalizando-se no ano seguinte com severidades de até 10% (PLOPER et al., 2001). Existem antecedentes que citam sua ocorrência em Sáenz Peña, na Província de Chaco, nos anos 1974, 1977 e 1979 (BONACIC & CAMPAGNAC, 1982).

2.2 Etiologia

O agente causal da mancha olho-de-rã é o fungo *Cercospora sojina* Hara. Na fase teleomórfica pertence à classe Dothideomycetes, ordem Capnodiales, família Mycosphaerellaceae.

Na fase anamórfica, se encontra dentro da classe Deuteromycetes, ordem Hyphomycetales, família Dematiaceae. O gênero é *Cercospora* (ALEXOPOULOS et al., 1996).

2.3 Sintomatologia

Os sintomas típicos são lesões necróticas que ocorrem principalmente nas folhas.

No início, as lesões constituem-se por pequenos pontos pardo-avermelhados, podendo atingir a 5 mm de diâmetro. Normalmente as manchas são isoladas, pequenas de cor pardo-avermelhadas variando de 0,25 a 0,5 mm de diâmetro. Com o passar do tempo, o diâmetro alcança até 8 mm e a cor começa a esmaecer no centro da mancha. Porém na margem forma se um anel pardo-avermelhado, delimitado nitidamente do verde normal da folha, sem a presença de uma zona de tecido clorótico (halo). Em todos os estágios, a cor do tecido doente é mais escura no lado inferior da folha. A cor escura é devido aos fascículos de conidióforos que se desenvolvem nos dois lados da lesão, sendo mais numerosos no lado inferior. Estes se desenvolvem no centro da lesão e emprestam uma coloração escura ao tecido doente. Recentemente, Carmona et al. (2009) reportaram sintomas observados nas hastes e vagens.

As sementes também podem ser infectadas por *C. sojina*, apresentam a área colonizada sem brilho e às vezes saliente ou deprimida, e com a película ou membrana que reveste internamente a vagem aderida as lesões (REIS, 1974).

A toxina cercosporina produzida pelo fungo é ativada pela luz, tendo baixa toxicidade no escuro. Este composto absorve a energia da luz e é convertida em uma molécula livre de oxigeno ($^1O_2$) que logo reage com outra molécula de oxigênio (O_2^-) produzindo o efeito tóxico. A toxicidade se produz pela oxidação de lipídios,

proteínas e ácidos nucléicos da membrana da célula afetada conduzindo a sua morte (DAUB & CHUNG, 2007).

2.4 Ciclo biológico da doença

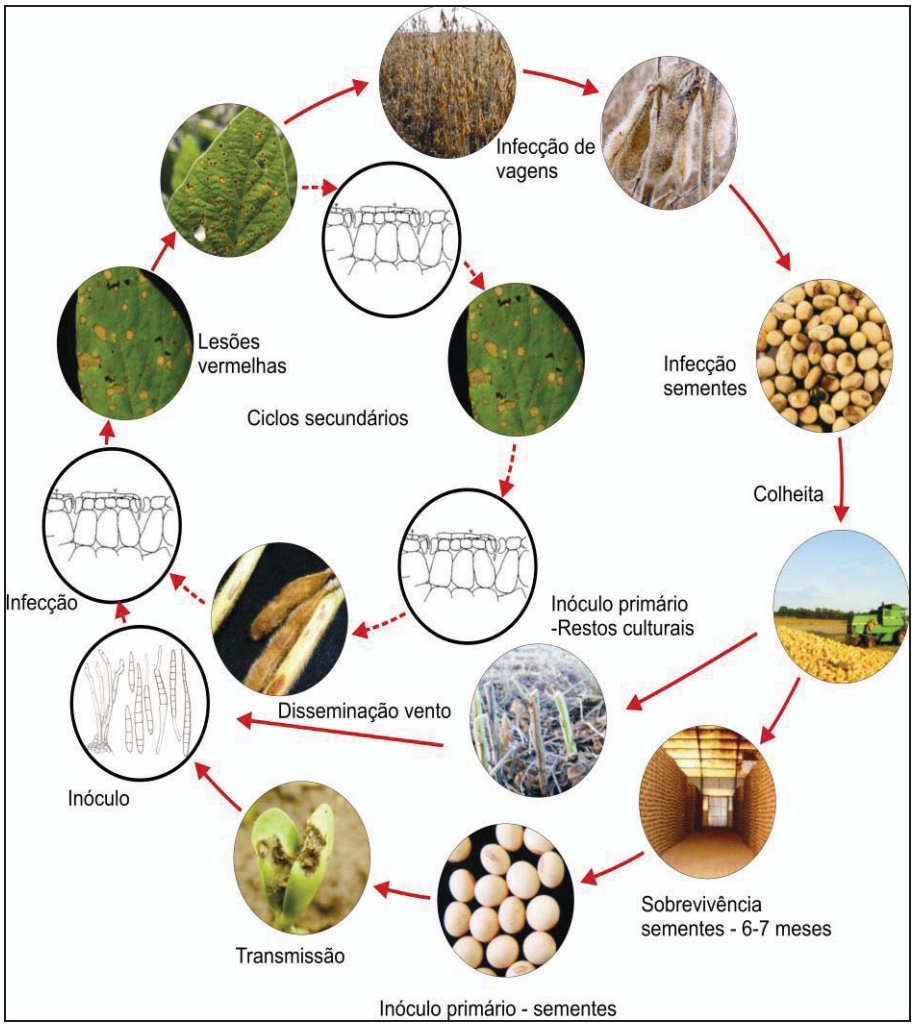

Figura 1. Ciclo da mancha foliar olho-de-rã, em soja (REIS & DANELLI, 2010 dados não publicados).

2.4.1 Fontes de inóculo e sobrevivência

O fungo *C. sojina* é um patógeno necrotrófico, portanto sobrevive saprofiticamente como micélio em restos culturais e sementes, sendo as principais fontes de inóculo primário. Na entre safra pode sobreviver também em plantas voluntárias de soja.

2.4.2 Disseminação

O fungo tem esporos secos, por tanto a liberação, remoção e disseminação dos conídios ocorrem pelo vento a curtas distâncias por ter conídios grandes e pesados. Assim, o inóculo é transportado para outras lavouras provocando infecções primárias e secundárias na soja.

2.4.3 Infecção

O processo de infecção vai desde a penetração do patógeno no hospedeiro até o aparecimento do sintoma. Este processo requer a presença de água livre sobre a superfície do órgão. Os conídios de *C. sojina*, uma vez depositado na superfície dos órgãos da soja, principalmente no folíolo, se fixa e emite o tubo germinativo para iniciar o processo de penetração. Os primeiros sintomas são observados a partir dos oito dias. A condição ambiental requerida para a infecção é de temperatura média de 25°C e umidade relativa do ar superior a 90% (PHILLIPS, 1999).

2.4.5 Colonização

A colonização do fungo se produz principalmente pela ação da toxina cercosporina, que age causando dano na membrana ou provavelmente liberando produtos celulares para os espaços intercelulares que o fungo utiliza para crescer e esporular (DAUB & CHUNG, 2007).

2.4.6 Produção de inóculo

O inóculo é produzido sobre fascículos de conidióforos (4-6 x 52-120 μm) que variam em número de 2 a 25, surgindo de um estroma escuro (PHILLIPS, 1999).

2.5 Variabilidade genética

O controle de *C. sojina* tem sido feito principalmente através do uso de variedades resistentes. Mas o fungo apresenta grande variabilidade genética. Cultivares resistentes rapidamente tornam-se suscetíveis com o desenvolvimento de novas raças (YORINORI, 1989). Huo et al. (1988) citaram a ocorrência de 11 raças na China, encontrando se atualmente 14. Entre estas, as raças 1, 7 e 10 foram consideradas as mais importantes.

Nos Estados Unidos foram reportadas 12 raças de *C. sojina.* O uso de cultivares resistente reduziu a incidência de *C. sojina* até o final de 1950, quando surgiu a raça 2 (ATHOW et al., 1962). Em meados dos anos 1960s, as raças 3 e 4 foram detectados na Carolina

do Norte (ROSS, 1968) e a raça 5 foi identificada em 1978 (PHILLIPS & BOERMA, 1981). A maioria dos cultivares foram suscetíveis à raça 5.

Três genes simples que proporcionam resistência à *C. sojina*: Rcs1 em Lincoln foi o primeiro gene que confere resistência para a raça 1 de *C. sojina* (ATHOW & PROBST, 1952), Rcs2 confere resistência à raça 2 no cultivar Kent (ATHOW et al., 1962) e Rcs3 'Davis' confere a resistência à raça 5 e para as outras raças conhecidas nos Estados Unidos (PHILLIPS & BOERMA, 1982) como também para os isolados brasileiros (YORINORI, 1992). Outros genes dominantes para resistência à raça 5 foram encontrados nos cultivares Ransom, Stonewall, e Lee, em 1993 (PACE et al., 1993). Outro gene dominante (relatado como no alélico para Rcs3) do cultivar de Pequim foi encontrado mais tarde, que outorgou resistência contra vários isolados de *C. sojina* (BAKER et al., 1999).

No Brasil, Casela et al. (1979) determinaram a ocorrência das raças 3 e 4 e a possibilidade de ocorrência de novas raças do fungo. Em 1982, foi constatada a ocorrência da raça 5 até então não identificada (CASELA et al., 1982). Yorinori (1989) identificou vinte raças mais de *C. sojina* no Brasil. Em 1999, Yorinori (1997) encontrou duas raças novas, os isolados MA-22-98 e MA-24-98, designados como raças Cs -24 e Cs -25.

O aparecimento de novas raças virulentas a *C. sojina*, como as raças 2, 3, 4 e 5, e a quebra associada à resistência a *C. sojina,* demonstraram a necessidade de identificar as fontes de resistência genética ao patógeno.

Na Argentina, na atualidade não se identificam as raças ocorrentes. A maior limitação para sua determinação é a obtenção dos hospedeiros diferenciais.

2.6 Esporulação e germinação de conídios de *Cercospora sojina* ***in vitro***

Pesquisas realizadas por Veiga (1973) relatam que a máxima esporulação do fungo é obtida em meio de cultura ágar V-8 ou ágar farinha de aveia, sob regime luminoso de 12 h de luz e 12 h de escuro.

Em outras pesquisas realizadas com este fungo o meio comumente utilizado é o ágar V-8. Não existem citações sobre pesquisas realizadas avaliando o efeito do potencial osmótico, o pH e a utilização do papel de filtro como substrato na esporulação e germinação dos conídios de *C. sojina.*

2.7 Controle da doença

2.7.1 Controle genético

A resistência à *C. sojina* em soja comporta-se como um caráter quantitativo. Os efeitos genéticos mais importantes na determinação dos caracteres relacionados com a resistência são os efeitos gênicos aditivos e de dominância (MARTINS FILHO et al., 2002).

A doença pode ser controlada geneticamente por tanto deve ser avaliado permanentemente a reação dos cultivares das diferentes regiões.

Na Argentina, a doença apresentou-se em vários genótipos de ciclos curtos e intermediários. A resistência foi incorporada em grupos de maturação longos, pois a doença iniciou-se no noroeste argentino, mas é preciso incorporar resistência nos ciclos curtos e intermediários (CARMONA, 2009).

2.7.2 Controle cultural

O fungo não causa infecção em outra cultura e não existe informação de sua sobrevivência em plantas daninhas (CARMONA, 2009).

O fungo sobrevive em restos culturais o que representa uma importante fonte de inóculo para a safra seguinte. Portanto, a rotação de culturas é uma ferramenta necessária para interromper o ciclo do fungo a qual pode ser realizada na região nordeste de Argentina com milho, girassol, algodão, etc.

2.7.3 Controle químico em sementes

De acordo com Scandiani et al., (2009) o controle químico na semente é realizado com sucesso com fungicidas com ação erradicante como alguns benzimidazóis e em misturas como carbendazim+tiram e tiofanato metílico+ piraclostrobina.

Seu controle na semente é importante, pois representa uma fonte de inóculo primário e que pode ser levado a grandes distâncias.

2.7.4 Controle químico em órgãos aéreos

O controle químico em órgãos aéreos tem sido recomendado a partir do estádio R3, após precipitações pluviais ou em infecções tardias. Recomenda-se aplicações de estrobilurinas e triazóis.

Embora o carbendazim tenha um efeito fungitóxico, não é recomendável sua aplicação em forma isolada a fim de evitar a redução da sensibilidade ao fungicida (CARMONA, 2009).

CAPITULO I

IDENTIFICAÇÃO DO AGENTE CAUSAL DE MANCHA FOLIAR OLHO-DE-RÃ EM SOJA

DIANA ERICA GÓMEZ[1] & ERLEI MELO REIS[2]

RESUMO - A mancha olho-de-rã, causada por *Cercospora sojina* é uma doença da soja [*Glycine max* (L.) Merr.] que ocorre em lavouras desta leguminosa em todos os países onde é cultivada. Este trabalho teve com objetivo caracterizar o agente causal da mancha olho-de-rã, isolado de folíolos de soja provenientes da Região Pampeana da República Argentina. Os experimentos foram realizados em câmaras de crescimento do Laboratório de Fitopatologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo. Procedeu-se à incubação de tecidos foliares lesionados e posterior isolamento do fungo em meio de batata sacarose ágar (BSA) e em ágar V-8, incubando-se em câmara de crescimento para a esporulação. Realizaram-se medições de 400 conídios, quantificando-se o número de septos produzidos nos dois substratos. O tamanho (comprimento e largura) dos esporos foi de 7-36 x 1-4 µm em BSA e de 12-45 x 2-4 µm em meio V-8. O número de septos foi de 1 - 10 e 2 - 10

[1] Engenheira Agrônoma, mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia e pesquisadora de Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria, INTA Sáenz Peña.

[2] Orientador, Engenheiro Agrônomo, Dr., professor da FAMV/PPGAgro/UPF. erleireis@tpo.com.br

respectivamente para os dois substratos. A suspensão de esporos (40.000 conídios.mL^{-1}) de *C. sojina* foi inoculada por pulverização sobre folíolos de soja para comprovar sua patogenicidade. Com base na mensuração dos esporos, septação, patogenicidade e sintomas comparados com descrições da literatura confirma-se que o fungo isolado de soja corresponde a *Cercospora sojina* Hara.

Palavras-chave: *Glycine max*, *Cercospora sojina*, postulados de Koch.

IDENTIFICATION OF THE CAUSAL AGENT OF FROGEYE LEAF SPOT OF SOYBEAN

DIANA ERICA GÓMEZ[1] & ERLEI MELO REIS[2]

ABSTRACT - The frogeye leaf spot, caused by *Cercospora sojina* is a disease of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] that occurs in this legume crop in all countries where it is grown. The objective of this work was to characterize the causal agent of frogeye leaf spot isolated from soybean leaflets from the Pampean Region of Argentina. The experiments were conducted in growth chambers at the Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine of University of Passo Fundo. Infected leaf tissues were incubated to promote sporulation and subsequent isolation of the fungus on potato saccharose agar (PSA) and V-8 agar. Measurements of 400 conidia and counting the number of septa produced in the two substrates. The size (length and width) of spores was 7-36 x 1-4 µm PSA and 12-45 x

2-4 µm in V-8 medium. The number of septa was 1-10 and 2-10 respectively for the two substrates. A spore suspension (40.000 conidia.mL^{-1}), was inoculated by spraying on soybean leaflets to prove their pathogenicity. Based in the measurement of spores, septation, pathogenicity and symptoms compared with descriptions of the literature confirmed that the fungus isolated from soybean corresponds to *Cercospora sojina* Hara.

Keywords: *Glycine max, Cercospora sojina*, Koch's postulates.

1 INTRODUÇÃO

A mancha foliar olho-de-rã foi citada pela primeira vez na cultura de soja [*Glycine max* (L.) Merr.] no Japão em 1915 (HARA, 1915). Mais tarde foi descrita nos Estados Unidos em 1924 (MELCHERS, 1925). Na América do Sul o primeiro relato foi feito no Brasil, no Estado de Paraná, em 1971 (YORINORI & GARCIA, 1977). Nos anos subseqüentes a doença foi observada no Rio Grande do Sul (REIS & KIMATI, 1973). Recentemente foi descrita na República Argentina (PLOPER et al., 2001) com uma freqüência de 100% em lavouras de algumas regiões (CARMONA et al., 2009).

O agente causal da mancha olho-de-rã na cultura de soja é o fungo *Cercospora sojina* Hara. Microscopicamente apresenta conidióforos pigmentados, marrom escuro que surgem de um estroma em fascículos de 2 a 25. São septados e apresentam geniculações proeminentes e cicatrizes no local de fixação dos conídios no conidióforo (PHILLIPS, 1999). Os conídios são multiseptados,

alongados, diminuindo o diâmetro para o ápice, são hialinos quando jovens e mais escuros quando envelhecem. Apresentam cicatrizes na base coincidentemente com o lugar de fixação ao conidióforo (PHILLIPS, 1999).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de comprovar que o fungo isolado de sintomas da mancha foliar olho-de-rã trata-se de *C. sojina.*

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia e casa de vegetação da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo – RS em abril de 2009.

2.1 Indução da esporulação de *Cercospora sojina*

O isolamento do fungo foi realizado partir de folhas de soja, com sintomas da mancha foliar olho-de-rã, coletadas na Região Pampeana da República Argentina, na safra 2008/2009.

Foram recortados discos das manchas foliares com um furador de rolha de 3,0 mm de diâmetro. Realizou-se a desinfestação dos tecidos com uma solução de etanol durante 1 minuto e, logo a seguir, foram transferidos para uma solução aquosa de hipoclorito de sódio 1,0 % durante três minutos. Posteriormente foram lavados três vezes com água destilada para retirar o excesso do hipoclorito de sódio. Vinte e cinco discos desinfestados foram distribuídos em forma

eqüidistante em caixas de acrílico (11 x 11 x 3,5 cm de altura, tipo gerbox), contendo uma espuma de nylon e duas folhas sobrepostas de papel filtro, saturados com água destilada e esterilizada. As caixas foram mantidas por quatro dias em câmara de crescimento com temperatura de 25ºC±2 e fotoperíodo de 12 horas, propiciado por quatro lâmpadas fluorescentes 60 watts distantes 20 cm da superfície dos gerboxes.

2.2 Isolamento do fungo

Após a esporulação do fungo sobre os tecidos foliares, foi realizado o isolamento monospórico. Sob uma lupa binocular (Zeiss, Stemi 2000- C) e com auxílio de uma agulha histológica flambada, transferiram-se conídios para uma placa de petri contendo meio de cultura de batata sacarose ágar (BSA) preparado segundo Fernandez (1993).

2.2 Obtenção e ajuste da concentração de inoculo

Para a prática dos Postulados de Koch, colônias monospóricas foram transferidas para placas de petri contendo BSA para multiplicação e esporulação do fungo. A remoção dos esporos foi feita pela raspagem superficial das colônias puras com auxílio de pincel de camelo N^{o}20 e água destilada. Desta suspensão de esporos, com uso de micropipetador transferiu-se 0,01 mL, para uma lâmina de microscopia, coberta com lamínula e feita a contagem dos esporos em microscópio óptico determinando o número de conídios neste volume.

A partir desta suspensão concentrada, por diluição foi preparada uma suspensão com densidade de inóculo de 40.000 conídios.mL^{-1} de água acrescida de uma gota de espalhante, polioxietilenosorbitanomonolaurato (Tween 20 – Sinth) para melhorar a distribuição da suspensão do inóculo sobre os folíolos de soja.

2.3. Inoculação

A inoculação foi feita pela pulverização do inóculo sobre folíolos de soja do cultivar BMX Magna RR no estádio V2-V3 (FEHR et al., 1971) até o ponto de escorrimento.

2.4 Incubação

Logo a seguir, as plantas foram mantidas em câmara úmida com temperatura de 25ºC ± 2 e fotoperíodo de 12 horas durante 24 horas. Posteriormente a cobertura plástica foi removida e as plantas mantidas no mesmo ambiente por 18 dias aproximadamente, até a manifestação dos sintomas foliares.

2.5 Avaliação

Decorridos 18 dias foi feita a contagem do número de lesões.folíolo^{-1} e medido o seu diâmetro com um paquímetro digital marca Mitutoyo Digimatic Caliper.

2.6 Reisolamento

No reisolamento do fungo das folhas inoculadas, foram cortados discos de tecido com sintomas, utilizando um furador de rolha, e logo foram submetidos a desinfestação durante três minutos com solução aquosa de hipoclorito de sódio a 1,0 % e lavados com água destilada e esterilizada para retirar o excesso de desinfetante.

Os discos foram distribuídos em caixas de acrílico (11 x 11 x 3,5 cm de altura), contendo espuma de nylon e duas folhas sobrepostas de papel de filtro, embebidas em água destilada e esterilizada. Essas caixas foram incubadas por 15 dias em câmara de crescimento até a esporulação do fungo.

2.7 Mensurações de conídios

Após o reisolamento, desenvolvimento e esporulação da colônia do fungo nos meios BSA e ágar V-8, realizou-se o preparo de lâminas microscópicas com as estruturas do patógeno. A observação das lâminas foi realizada no microscópio ótico (Olympus CX 31 em magnitude de 40 vezes). Foram registradas as características morfológicas de 400 estruturas do fungo úteis a sua identificação, tais como: forma, tamanho, número de septos, cor dos conídios e conidióforos e coloração das colônias em meio de cultura BSA e ágar V-8.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Aspectos morfológicos do fungo

Do isolamento do fungo no meio BSA, observou-se aos 15 dias de incubação uma colônia filamentosa de 25 mm de diâmetro, elevada, circular, com micélio pouco desenvolvido (Foto 1). A coloração escura, com bordos definidos, composta por fascículos de conidióforos escuros e abundantes conídios hialinos (Foto 2). As hifas são de coloração pardo-escuras e com paredes lisas, conídios hialinos, com forma alongada a fusiforme, formados sobre conidióforos simples, geniculados e pardo escuro.

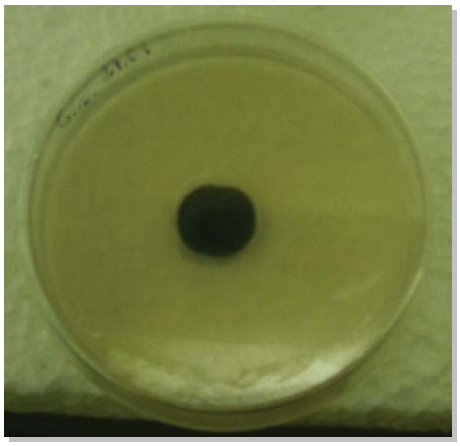

Foto 1. Colônia de *Cercospora sojina* no meio BSA.

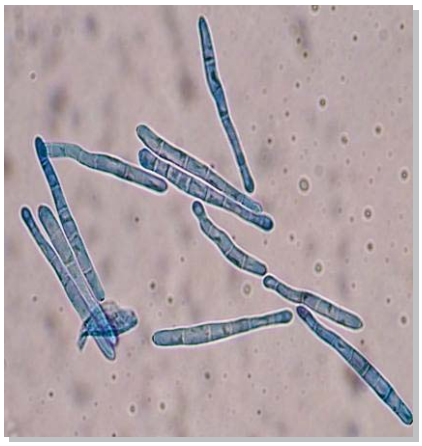

Foto 2. Conídios de *Cercospora sojina.*

A colônia tem forma radial e concêntrica, cor verde-oliva nas margens, cinza devido à presença de frutificações e pardo mais no centro.

Foto 3. Sintoma da mancha foliar olho-de-rã em folíolos de soja.

Os sintomas observados no teste de patogenicidade foram lesões necróticas isoladas, circundadas por um anel de cor pardo-avermelhado e com o centro mais claro (Foto 3). O tamanho das manchas variou de 0,5 a 10 mm de diâmetro coincidente com o relatado por Phillips (1999). No centro das lesões observou-se o desenvolvimento dos conidióforos e conídios.

Os resultados das mensurações de 400 conídios em meio BSA e no meio ágar V-8 constam na Tabela 1 e podem ser comparados com as descrições da literatura na Tabela 2.

Tabela 1. Dimensões dos conídios e número de septos de *Cercospora sojina* cultivado em dois meios de cultura

Substrato	Comprimento (µm)	Média (µm)	Largura (µm)	Média (µm)	Septos (n°)	Média
BSA	7-36	**20,3**	1-4	**2,55**	1-10	**6,8**
V-8	12-45	**26,8**	2-4	**2,94**	2-10	**3,9**
Média		**23,55**		**2,75**		**5,35**

Tabela 2. Dimensões dos conídios e número de septos de *Cercospora sojina* obtidos por diferentes autores

Mensurações (µm)		Septos (n°)	Autor
Comprimento	**Largura**		
24-108	**6-8**	0-10	Reis, 1974
39-70	**5-7**	-	Phillips, 1999
38- 62	**5-9**	2- 6	Ploper et al., 2001
40-60	**6-8**	0-10	Mengistu et al., 2002
26-111	**5,2-7,4**	1-9	Carmona et al., 2009

(-) Não informado.

Os valores de comprimento dos conídios obtidos neste trabalho são menores (7 - 45 µm) do que os relatados (Tabela 2). Quanto a largura (1 – 4 µm) também são menores do que relataram

Reis (1974), Ploper et al. (2001) e Carmona et al. (2009). Isto pode ser atribuído à nutrição fornecida pelo substrato usado pelos outros autores, pela idade das colônias e as condições de incubação (oscilações de temperatura). Por outro lado, a largura dos conídios é similar as descrições realizadas por Phillips (1999) e Carmona et al. (2009).

O número de septos foi coincidente com as observações realizadas por Reis (1974), Phillip (1999), Ploper et al. (2001) Mengistu et al. (2002) e Carmona et al. (2009).

4 CONCLUSÕES

O fungo isolado trata-se de *Cercospora sojina* Hara, confirmado por sua prova de patogenicidade (sintomas reproduzidos), caracterização morfológica (comprimento, largura e número de septos dos conídios) do fungo isolado e reisolado e pela comparação com as descrições disponíveis na literatura.

CAPÍTULO II

INFLUÊNCIA DE SUBSTRATOS, LUZ, PAPEL DE FILTRO, pH E POTENCIAL OSMÓTICO NA ESPORULAÇÃO DE *Cercospora sojina*

DIANA ERICA GÓMEZ[1] & ERLEI MELO REIS[2]

|**RESUMO** - Em experimentos conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, foram avaliadas a influência de substratos, luz, papel de filtro, pH e potencial osmótico na esporulação de conídios de *Cercospora sojina* agente causal da mancha foliar olho-de-rã da soja. Foram testados os meios ágar batata sacarose, ágar V-8, ágar extrato de tomate, ágar extrato de folha de soja, ágar grãos de soja, ágar farelo de soja, ágar farinha soja e ágar farinha de aveia, acrescidos na superfície com e sem papel de filtro e submetidos a dois regimes luminosos, com luz de 12 h a 25°± 2°C e sem luz. O material permaneceu em câmara de crescimento por 15 dias. Os esporos foram removidos adicionando-se à placa 5 mL de água destilada esterilizada realizando raspagem superficial com

[1] Engenheira Agrônoma, mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia e pesquisadora de Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria, INTA Sáenz Peña.

[2] Orientador, Engenheiro Agrônomo, Dr., professor da FAMV/PPGAgro/UPF. erleireis@tpo.com.br

pincel. Com um micropipetador foi transferido 1,0 mL dessa suspensão para tubos de ensaio contendo 10 mL de água. A contagem a quantidade de conídios produzida nos tratamentos foi feito pelo preparo de lâminas com 10 μL da suspensão observados ao microscópio. O delineamento experimental usado foi fatorial triplo 8x2x2 (substratos x luz/escuro x com/sem papel de filtro), com 4 repetições distribuídas ao acaso. Usou-se o meio ágar V-8 ajustando o pH com HCl 0,1 N ou NaOH 0,1 N antes da autoclavagem nos valores: 3, 4, 5, 6, 7 e 8, sendo o pH do meio ágar V-8 de 6,7. A avaliação foi realizada aos 7 dias de incubação. Ajustou-se o potencial osmótico com manitol e KCl no meio ágar V-8 para -0.6, -0.8 e -1 Mpa. Os dados foram submetidos à análise da regressão. O fungo esporulou em todos os meios de cultura avaliados. A esporulação de *C. sojina* foi menor com presença de manitol do que com KCl em todas as concentrações testadas.

Palavras-chave: produção de inóculo, soja, *Glycine max*

INFLUENCE OF SUBSTRATES, LIGHT, FILTER PAPER, pH AND OSMOTIC POTENTIAL ON THE SPORULATION OF *Cercospora sojina*

DIANA ERICA GÓMEZ[1] & ERLEI MELO REIS[2]

ABSTRACT- In experiments conducted in the laboratory the influences of substrate were quantified light, paper of filter, pH and osmotic potential in sporulation of causal agent of frogeye leaf spot. They were proven average the potato sacarose agar, V-8 agar, tomato extract agar, extract of soybean leaf agar, soybean grains agar, soybean meal agar, soybean flour agar, oats flour agar added to the surface with and without filter paper put under two luminous regimes, with photoperiod of 12 h to 25°± 2°C and without light. The material remained in chamber of growth by 15 days. The spores were removed adding itself to the plate 5 mL distilled water sterilized scraped with brush. With a micropipette 1,0 mL of that suspension to test tubes was transferred containing 10 mL of distilled water sterilized. The amount of conidia produced in the treatments was counted in observed microscopic preparations in microscope with 10 µl of suspension. The used experimental design was factorial triple 8x2x2 (substratum x light/dark x with/without filter paper) with 4 at random distributed repetitions. The medium of culture V-8 agar were used fitting the pH with HCl 0,1N or NaOH 0,1N before placing in sterilizer values 3, 4, 5, 6, 7 and 8 being the pH of medium of culture V-8 agar of 6,7. The

evaluation was realized to the 7 days of incubation. The osmotic potential was fit with manitol and KCl in the middle V-8 agar to -0.6, -0.8 and -1Mpa. The results were analyzed by regression. The fungus sporulated in all the means of evaluated cultures. The sporulation of *C. sojina* was smaller with the presence of manitol that with KCl in all the evaluated concentrations.

Key words: inoculums production, soybean, *Glycine max*

1 INTRODUÇÃO

Os fungos requerem substratos especiais para seu isolamento, crescimento vegetativo e esporulação (AGRIOS, 2005).

Em alguns trabalhos de fitopatologia é necessária a produção de grandes quantidades de esporos no menor tempo e com o menor custo possível.

Os substratos devem conter todos os nutrientes necessários para estimular o crescimento, como fonte de carbono (carboidratos), fonte de nitrogênio, minerais, etc. A presença de uma substancia inerte como o ágar permite a difusão do oxigênio e a dissolução de nutrientes (ROMO, 1990).

O carbono é o elemento mais importante para o desenvolvimento do patógeno. Além de constituir a principal fonte de energia, o carbono é um dos elementos estruturais e funcionais necessários para a síntese de enzimas (ALFENAS & MAFIA, 2007).

Existem vários tipos de meios de cultura, alguns naturais à base de sucos de frutas, infusões vegetais ou grãos (CORTÉS, 2005). O meio mais comum é batata sacarose ágar (BSA) já que favorece o crescimento para vários fungos, mas não de todos (AGRIOS, 2005).

O efeito de papel de filtro se deve à possibilidade do aumento da superfície esporulante, o que foi observado nas espécies de fungos *Helmintosporium* spp e *Alternaria* spp. quando se sobrepuseram aos meios de cultura solidificados (Reis apud LUKENS, 1960; MACDONAL & MARTENS, 1963 ; BEAN, 1964).

Além dos constituintes nutricionais, o pH e o potencial osmótico podem também ter efeito na esporulação. Os fungos, em geral, toleram uma ampla faixa de pH variando de 2 a 9. Para a maioria dos fungos o pH ótimo se encontra ao redor de 5,6 (CORTÉS, 2005).

Para o fungo *Cercospora sojina* Hara, não se encontraram relatos da influencia do pH na esporulação e germinação dos conídios, mas os meios ágar V-8 e ágar farinha de aveia favorecem a esporulação do fungo sob fotoperíodo (VEIGA, 1973).

O potencial osmótico foi identificado como um parâmetro importante na ecología e o crecimento dos fungos fitopatógenos (DAVIS et al., 2000). Expressa e mede o estado de energia livre da água em diferentes medidas (atmosferas, bares, pascales o megapascales) e está determinado pela pressão e pela atividade da água. Cada espécie de ser vivo tem um potencial osmótico ótimo para o normal desenvolvimento de suas funções vitais.

A restrição hídrica tem efeito sobre a germinação de sementes de plantas, mas seu uso tem sido adaptado para a quantificação de fungos em testes de sanidade de sementes para atrasar a germinação, favorecendo o desenvolvimento de fungos.

Numa pesquisa realizada por Carvalho (1999) se relatou que o uso da restrição hídrica em meio BDA com manitol foi eficaz na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) em sementes de feijão, havendo estímulo ao crescimento radial das colônias fúngicas até uma restrição hídrica de -0,8 MPa.

O objetivo deste trabalho foi quantificar a esporulação de *C. sojina* em diferentes substratos, com e sem presença de papel de filtro, submetidos ao fotoperíodo e escuro. Além disso, se estudou o efeito do pH e do potencial osmótico do substrato na esporulação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório Regional de Patologia Vegetal da Estação Experimental Agropecuária (EEA) Sáenz Peña do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA), República Argentina e no Laboratório de Fitopatologia e casa de vegetação da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo – RS.

2.1 Influência de meios de cultura, da superposição de papel de filtro e da luz na esporulação de *Cercospora sojina.*

Foram testados os meios batata sacarose ágar (BSA), ágar V-8, ágar extrato de tomate (TUITE, 1973), ágar extrato de folha de soja cujo preparo foi realizado com 4 g de folíolos de soja triturados e 12 g de ágar em 1 L de água (REIS, informação pessoal), ágar grãos de soja cujo preparo foi realizado com 4 g de sementes trituradas de soja e 12 g de ágar em 1 L de água (REIS, informação pessoal), ágar farelo de soja preparado com 40 g de farelo de soja cozido durante 1 hora e 12 g de ágar em 1 L de água (REIS, informação pessoal), ágar farinha soja preparado com 40 g de farinha de soja cozida durante 1 hora e 12 g de ágar (REIS, informação pessoal), e ágar farinha de aveia (FERNANDEZ, 1993). Quantificou-se o efeito da sobreposição de papel de filtro, com e sem luz sobre a esporulação de *C. sojina* em cada substrato.

O inóculo utilizado foi isolado de folíolos afetados de soja provenientes da Região Pampeana de Argentina.

Foram preparadas 20 placas de petri plásticas (9,0 cm de diâmetro) com cada meio de cultura. Em 10 placas foram colocadas uma lâmina de papel de filtro esterilizada sobre o substrato e nas 10 restantes não se utilizou papel de filtro. A metade destes tratamentos, com e sem papel de filtro, foram submetidos à fotoperíodo de 12 horas incubados em câmara de crescimento com a luz fornecida por quatro lâmpadas fluorescentes OSRAM Universal, 40 watts, 40 cm distante

da superfície das placas. A outra metade foi mantida no escuro, envolvidas em papel alumínio. Todas as placas foram mantidas nas mesmas condições de temperatura (25±2°C), permanecendo em câmara de crescimento por 15 dias.

Após o período de incubação e com auxílio de um pincel de pêlo de camelo N°20, foram removidos os esporos adicionando-se a cada placa 5 mL de água destilada esterilizada. Com um micropipetador foi transferido 1,0 mL dessa suspensão para tubos de ensaio contendo 10 mL de água. Desta suspensão assim diluída foram pipetados 10 μL para uma lâmina de microscopia, recoberta com uma lamínula. Foi realizada a contagem do número de conídios neste volume ao microscópio ótico, com magnitude de 40 vezes. Esse procedimento foi realizado quatro vezes para cada unidade experimental e a média foi utilizada na determinação do número de conídios.mL^{-1}. Calculou-se, em função dos 5,0 mL e da área da colônia do fungo, o número de esporos produzidos por cm^2 de meio de cultura.

O delineamento experimental foi fatorial triplo 8x2x2 (substratos x luz/escuro x com/sem papel de filtro), com quatro repetições distribuídas ao acaso submetidos ao teste de Tukey a 5%.

Os experimentos foram repetidos duas vezes.

2.2 Influência do pH do substrato na esporulação de *Cercospora sojina.*

O isolado utilizado foi fornecido pela Embrapa Soja. Neste experimento foi usado o meio ágar V-8, ajustando o pH com HCl 0,1 N ou NaOH 0,1 N antes da autoclavagem para os seguintes valores: 3, 4, 5, 6, 7 e 8, sendo o pH do meio ágar V-8 de 6,7. O pH foi determinado com um peagâmetro PHS-3B Labmeter Model PH2.

O preparo da suspensão, método de plaqueamento e as condições de incubação foram semelhantes ao ensaio anterior, mas avaliação foi realizada aos sete dias de incubação.

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise da regressão.

2.3 Influências do manitol e KCl na esporulação de *Cercospora sojina.*

Para este ensaio foi utilizado meio ágar V-8, ajustando o potencial osmótico com manitol e KCl nas concentrações que figuram na Tabela 1.

O isolado, o preparo da suspensão, o método de plaqueamento, as avaliações e as condições de incubação foram semelhantes aos ensaios anteriores.

Tabela 1. Relação de concentrações de manitol e KCl para os diferentes potenciais osmóticos

Potencial osmótico (MPa)	Manitol ($g.L^{-1}$)	KCl ($g.L^{-1}$)
0	0	0
-0,6	11,14	2,48
-0,8	14,86	3,34
-1,0	18,60	4,18

Os dados foram submetidos à análise da regressão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Influências de meios de cultura, da superposição de papel de filtro e fotoperíodo na esporulação de *Cercospora sojina.*

Tabela 2 – Influência de substratos, luz e papel de filtro na esporulação de *Cercospora sojina* (Nº conídios.cm²)

Substrato	Com papel		Sem papel		Média
	Com Luz	Sem Luz	Com Luz	Sem Luz	
BSA	A 11,1 a	A 9,8 a	A 8,5 a	A 8,35 a	**9,4**
Extrato de folha de soja	A 8,59 ab	A 9,71 a	B 7,6 ab	A 9,9 a	**8,9**
Extrato de semente de soja	A 11,1 a	A 10,3 a	B 6,12 ab	A 10,6 a	**9,5**
Extrato de tomate	A 9,7 a	A 9,1 ab	A 9,6 a	A 6,7 a	**8,7**
Farelo de soja	A 6,1 b	A 9,4 ab	A 9,1 a	B 5,7 b	**7,5**
Farinha de aveia	A 10,7 a	A 9,7 ab	B 7,8 ab	A 8,2 a	**9,1**
Farinha de soja	A 3,7 c	A 1,2 b	A 8,2 a	B 0,0 c	**3,2**
V-8	A 11,4 a	A 11,5 a	B 2,5 b	A 4,12 b	**7,3**
Média	**9,04 A**	**8,8 B**	**7,4 A**	**6,6 A**	
	A 8,94		**B 7,6**		
CV %	46,84				

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. Representa a média de dois experimentos. Dados transformados com a fórmula Log2.

Na Tabela 2 pode-se observar que não houve interação entre os meios e sim dentro dos tratamentos. O fator luz não exerce efeito significativo ao nível de significância de 5% nos substratos (F=1,0755) a diferença do fator papel (F=9,7143).

A interação de substrato x papel x luz foi significativa ao nível de probabilidades de 5% (F=2,3155).

Os resultados demonstram que este fungo esporula em todos os meios de cultura avaliados. Entretanto, a quantidade de esporos produzidos nos diferentes meios é altamente variável conforme com o relatado por Veiga (1973).

Sobre o efeito do papel de filtro ainda não foi encontrado na literatura referências de sua capacidade como indutor da esporulação do fungo *C. sojina.*

De igual maneira, não se encontraram referências dos efeitos dos meios ágar extrato de semente, ágar extrato de tomate, ágar farinha de soja, ágar farelo de soja e ágar extrato de folha.

Destacam-se os substratos BSA, ágar extrato de semente, ágar extrato de tomate, ágar farinha de aveia e ágar V-8 quando foram submetidos na luz e com papel de filtro.

No tratamento com luz e sem papel, os substratos BSA, extrato de tomate, farelo de soja e farinha de soja favoreceram a esporulação.

Quando os substratos foram submetidos no escuro e com papel de filtro, o substrato BSA, ágar extrato de folha, ágar extrato de

semente, ágar extrato de tomate e ágar farinha de soja foram os mais eficientes como indutores da esporulação.

Sem considerar o papel de filtro, estes resultados coincidem com os resultados encontrados por Veiga (1973) que demonstrou a capacidade do efeito indutor da esporulação dos meios ágar V-8 e ágar farinha de aveia.

No escuro e sem papel, o substrato ágar extrato de tomate e ágar V-8 foram o menos propicio para a esporulação de *C. sojina.*

É importante obter médios de cultura alternativos ao meio ágar V-8 devido a que não sempre se encontra disponível. O emprego de meios ágar extrato de semente, ágar extrato de semente, ágar extrato de tomate e ágar farinha de aveia com adição de papel de filtro são meios de baixo custo e de fácil preparação.

2.2 Influências do pH do substrato na esporulação de *Cercospora sojina.*

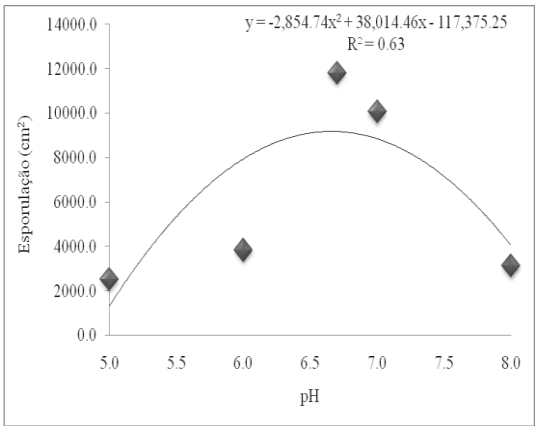

Figura 1. Efeito do pH na esporulação (conídios $n^o.cm^{-2)}$ de *Cercospora sojina* em meio ágar V-8 e 25±2°C.

Nos pH 3 e 4 não foi possível realizar a avaliação devido a não solidificação do meio ágar V-8 nesses valores.

Utilizando-se a função obtida $y = -2{,}854.7x^2 + 38{,}014.46x - 117{,}375.25$ no gráfico de regressão (com $R^2 = 0{,}63$), determinou-se que o pH no qual ocorre a máxima esporulação foi 6,7 (Figura 1).

Este resultado difere com uma pesquisa realizada por Aguirre et al., (2009) que avaliaram o efeito do pH na produção de conídios de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, não observando efeito significativo na produção de conídios, embora a maior esporulação se obteve no pH 6.

No caso de *C. sojina* ainda não foram encontradas pesquisas em relação ao efeito do pH na esporulação.

2.3 Influência do potencial osmótico do substrato na esporulação de *Cercospora sojina.*

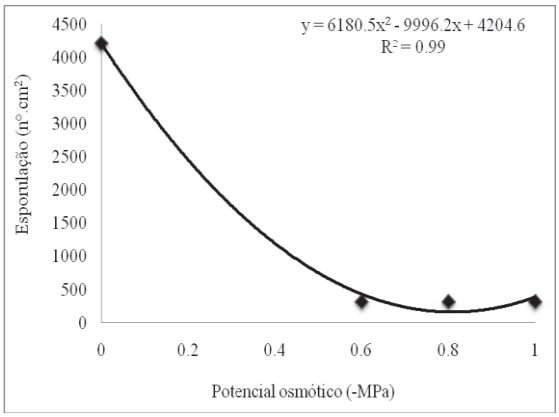

Figura 2. Efeito do potencial osmótico (-MPa) na esporulação (conídios n°.cm^{-2}) de *Cercospora sojina* em meio ágar V-8, com diferentes concentrações de manitol a 25±2°C.

Mediante a fórmula obtida $y=6180.5x^2-9996.2x+4204.6$ ($R^2=0,99$) (Figura 2) determinou-se que o potencial osmótico no qual ocorre a máxima esporulação foi de 0 MPa (sem manitol).

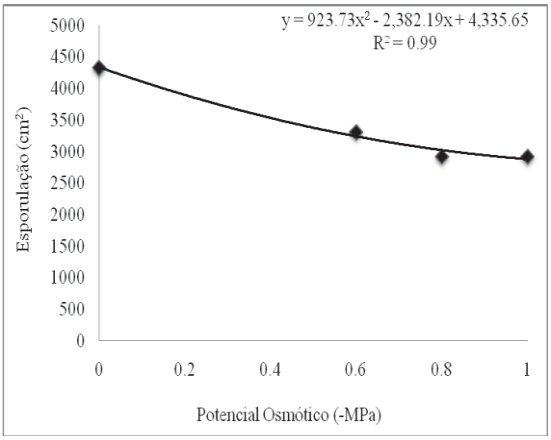

Figura 3. Efeito do potencial osmótico (MPa) na esporulação (conídios $n^o.cm^{-2}$) de *Cercospora sojina* em meio ágar V-8, com diferentes concentrações de KCl a 25±2°C.

Pode ser observado (Figuras 2 e 3) que o efeito negativo da esporulação de *C. sojina* foi maior com presença de manitol comparando com KCl em todas as concentrações testadas.

Estes resultados são similares ao relatado por Mendez & Pérez (2006) que demostram que o efeito negativo no crescimento de *Fusarium* foi maior utilizando KCl que sacarose.

A alteração do potencial osmótico com o objetivo de promover maior esporulação do fungo, não foi observada neste trabalho.

4 CONCLUSÕES

O fungo *C. sojina* esporula em diferentes substratos.

A esporulação de *C. sojina* é maximizada utilizando-se os meios BSA, ágar extrato de semente, ágar extrato de tomate, ágar farinha de aveia e ágar V-8, com papel de filtro, sob luz sendo isto importante para obter meios alternativos ao ágar V-8, sendo não sempre disponível, além de ser de fácil preparo e de baixo custo.

A esporulação máxima de conídios ocorre com pH 6,7 no meio ágar V-8 a 25±2ºC.

A presença de manitol influi negativamente na esporulação do fungo mais do que o KCl no meio ágar V-8 nos potenciais osmóticos -0.6, -0.8 e -1 MPa.

CAPITULO III

EFEITO DA DENSIDADE DE INÓCULO DE *Cercospora sojina* E DO ADJUVANTE NA INTENSIDADE DA MANCHA-OLHO-DE-RÃ

DIANA ERICA GÓMEZ[1] & ERLEI MELO REIS[2]

RESUMO- Este trabalho foi realizado em câmara climatizada do Laboratório Regional de Patologia Vegetal da Estação Experimental, INTA Sáenz Peña, Província de Chaco, Argentina. O objetivo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de inóculo de *Cercospora sojina* e do adjuvante na eficiência da infecção em condições controladas. O inóculo foi obtido a partir de folíolos infectados naturalmente provenientes da Região Pampeana da Argentina. Realizaram-se dois experimentos: com e sem adjuvante adicionado a suspensão de inóculo. Foram testadas nove concentrações de inóculo: 0; 10.000; 15.000; 20.000; 25.000; 30.000; 35.000 conídios.mL^{-1}. Plantas de soja do cultivar NK Coker 7.5 RR foram mantidas em câmara climatizada e inoculadas nos estádios V2-V3. Quantificou-se o número e o diâmetro das lesões em função das concentrações de inóculo utilizadas nos dois experimentos e do uso do adjuvante.

[1] Engenheira Agrônoma, mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia e pesquisadora de Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria, INTA Sáenz Peña.

[2] Orientador, Engenheiro Agrônomo, Dr., professor da FAMV/PPGAgro/UPF. erleireis@tpo.com.br

Observou-se que no tratamento sem adição de adjuvante houve aumento lineal do número e do diâmetro das lesões pelo aumento da concentração do inoculo. No tratamento com adjuvante observou-se um efeito negativo com o aumento na concentração de inoculo, sendo a que resultou no maior numero e diâmetro das lesões de $1x10^4$ conídios.mL^{-1}.

Palavras-chave: concentração de inóculo, conídios, adjuvante

EFFECT OF INOCULUM DENSITY OF *Cercospora sojina* AND ADJUVANT ON FROGEYE LEAF SPOT INTENSITY

DIANA ERICA GÓMEZ[1] & ERLEI MELO REIS[2]

ABSTRACT- This work was carried out in growth chamber of the Laboratory Regional of Pathology Vegetal of Estación Experimental Agropecuaria, INTA Sáenz Peña, Chaco, Argentina. The objective was to evaluate the effects of differents inoculums concentrations of *C. sojina* and the adjuvant under controlled conditions. The inoculum was obtained from infected leaves naturally proceeding from the pampeana region of Argentina. Two experiments were realized: with adjuvant and without. Nine concentrations of inoculums were evaluated: 0; 10.000; 15.000; 20.000; 25.000; 30.000; 35.000 conídios.mL^{-1}. Plants of soybean of cultivar NK Coker 7.5 were maintained in growth chamber and inoculated in the stages V2-V3,

using for the inoculation a manual sprayed. It was quantified number and diameter of lesions based on the concentrations of inoculum used in both experiments and the use of adjuvant. It was observed that in treatment without addition of adjuvant was a linear increase of number and diameter of spots by increase of the concentration of inoculums. In treatment with addition of adjuvant a negative effect was observed by increase of the concentration of inoculums, being that in the major number and diameter of the spots $1x10^4$ conídios.mL^{-1}.

Key words: inoculum concentration, conidia, adjuvant

1 INTRODUÇÃO

A infecção causada por o fungo *Cercospora sojina* Hara na cultura de soja produz lesões que variam de acordo com a resistência do cultivar, com as condições ambientais e a virulência do patógeno.

A densidade de inóculo é um dos fatores que pode afetar a reação da planta causando lesões de tamanhos e quantidades variáveis.

Para avaliar a reação de cultivares ou realizar estudos epidemiológicos específicos de um patógeno, se recorre à inoculação artificial, seja em casa-de-vegetação, câmara climatizada ou no campo (GILCHRIST, 2005).

O sucesso da inoculação é favorecido pela presença de água livre e temperatura ótima as quais são indispensáveis para os

processos de germinação e penetração nos tecidos sendo propiciados por câmara úmida e temperatura controlada.

Quanto maior a concentração de inoculo de fungos em geral, maior é a intensidade da doença, sendo mais utilizadas as concentrações de 10^3 a 10^6 esporos/mL. No entanto, é importante se usar a concentração mínima de inóculo capaz de produzir o nível desejado de doença (ALFENAS & MAFIA, 2007).

Este experimento foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes concentrações de inóculo de *C. sojina* e da adição de adjuvante na intensidade da doença.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido em câmara climatizada do Laboratório Regional de Patologia Vegetal da Estação Experimental Agropecuaria INTA Sáenz Peña, Província de Chaco, Argentina.

2.1 Cultivo de plantas

Plantas de soja do cultivar NK Coker 7.5 RR foram semeadas em cinco vasos com cinco sementes de soja. Para o controle de insetos as sementes foram tratadas com o inseticida imidacloprida (Gaucho) na dose de 50-70 mL/100 kg de sementes. Os vasos foram mantidos em câmara climatizada a 25°C de temperatura e 12 h de luz durante o desenvolvimento vegetativo das plantas.

2.2 Produção do inóculo

O inóculo foi obtido a partir de folíolos infectados naturalmente provenientes da Região Pampeana da Republica Argentina.

A partir das lesões presentes nos folíolos, 25 discos obtidos com furador de rolha foram desinfestados durante três minutos numa solução aquosa de hipoclorito de sódio a 1,0 % e posteriormente lavadas com água destilada e esterilizada para retirar o excesso de desinfestante. O material desinfestado foi colocado em caixas de gerbox de acrílico (11 x 11 x 3,5 cm de altura), contendo uma espuma de nylon e duas folhas sobrepostas de papel filtro embebidas em água destilada estéril. A incubação do material foi durante 15 dias a 25±2ºC e com 12 h de fotoperíodo até observar-se a esporulação do fungo.

Após, realizou-se o isolamento monospórico do fungo com auxilio de uma agulha histológica flambada transferindo esporos individuais para o meio de cultura batata sacarose ágar (BSA), (FERNANDEZ, 1993). As placas foram incubadas a 25±2ºC com fotoperíodo de 12 h até obter colônias com crescimento abundante.

2.3 Preparo da suspensão de inóculo

A partir das colônias desenvolvidas preparou-se a suspensão de conídios em água destilada com e sem adjuvante polioxietileno sorbitano monolaurato (Tween 20-Sinth) 2 gotas L^{-1}.

As concentrações testadas foram: 0; 10.000; 15.000; 20.000; 25.000; 30.000 e 35.000 conídios.mL^{-1}.

A densidade de inóculo foi determinada pela quantidade de conídios observados numa lâmina com 10 µL de água destilada estéril. O número de conídios foi quantificado por varredura no microscópio óptico.

2.4 Inoculação

As plantas mantidas em câmara climatizada foram inoculadas com dois a três trifólios (V2-V3) (FEHR, 1971). A inoculação das plantas foi feita com um aspersor manual atomizando o inóculo sobre as folhas até o ponto de escorrimento.

2.5 Incubação

Após a inoculação, cada vaso foi recoberto com saco plástico, fechado hermeticamente a fim de proporcionar uma câmara úmida por 48 h. Após, o plástico foi retirado e as plantas foram mantidas úmidas até o surgimento dos sintomas.

As plantas permaneceram em câmara climatizada com temperatura constante de 25±2°C com 12 h de fotoperíodo por 15 dias.

2.6 Avaliações

As avaliações foram realizadas 15 dias após a inoculação quantificando-se o número e o diâmetro das lesões (mm) por folíolo em função das diferentes concentrações de inóculo. O diâmetro das

lesões foi medido com o emprego de um paquímetro digital marca Mitutoyo Digimatic Caliper.

Utilizou-se quatro repetições e o experimento foi repetido duas vezes. Portanto, para a obtenção dos dados foi utilizado a média de dois experimentos. Os dados de concentração foram obtidos pelo ajuste da germinação de conídios em ágar água incubados durante 4 h a 25±2°C. A unidade experimental foi constituída por um vaso com 5 plantas. Os dados foram submetidos à análise de regressão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

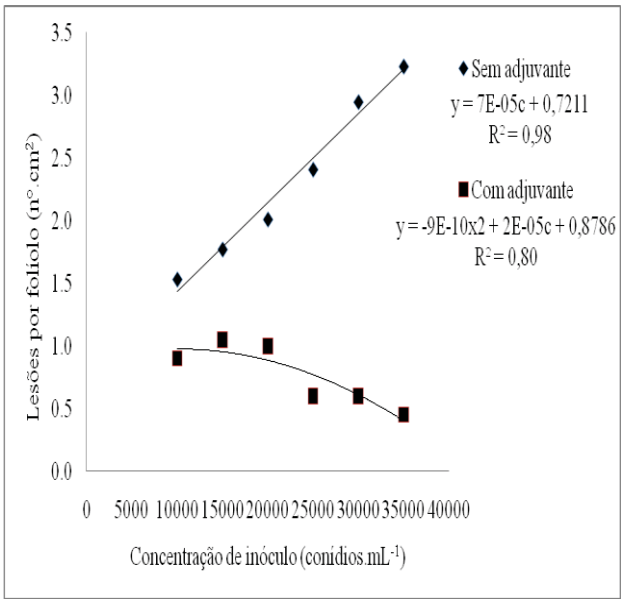

Figura 1– Efeito da concentração de inóculo (c) de *Cercospora sojina* sobre o número de lesões em folíolos de soja do cultivar NK Coker 7.5 RR em tratamentos com e sem adjuvante (2 gotas.L^{-1}). INTA Sáenz Peña. Argentina. 2010-2011

Observou-se que no tratamento sem adjuvante o número de lesões por folíolo aumentou em forma lineal com o incremento da concentração de conídios (Figura 1) de acordo com o mencionado por Alfenas & Mafia (2007). No entanto, quando com o uso de adjuvante, o numero de lesões por folíolo com o aumento da concentração de inóculo provavelmente devido ao mencionado por Van Der Plank (1975) que relata que as altas densidades de inoculo podem produzir um efeito antagônico na germinação dos esporos e ou devido à existência de limitados sítios de infecção. Por tanto a severidade da doença em alguns patossistemas pode aumentar até um ponto, acima da qual, pode ocorrer uma redução da intensidade da doença.

A concentração comumente utilizada para inocular *C. sojina* em diferentes trabalhos é de $4x10^4$ conídios.mL^{-1} conforme Ploper et al. (2001), Yang & Weaver (2001) e Gravina (2004).

Em pesquisa realizada por Carmona et al.. (2009) foi utilizada a concentração de $3x10^4$ conídios.mL^{-1}, contrariamente a Mengistu (2002) que empregou $3x10^5$ conídios.mL^{-1} e Bisht & Sinclair (1985) $2x10^4 \pm 1.000$ conídios.mL^{-1}. Por outro lado, a menor concentração utilizada foi utilizada por Yorinori & Klingelfuss (1999) a qual foi de $1,5 \times 10^4$ conídios.mL^{-1} .

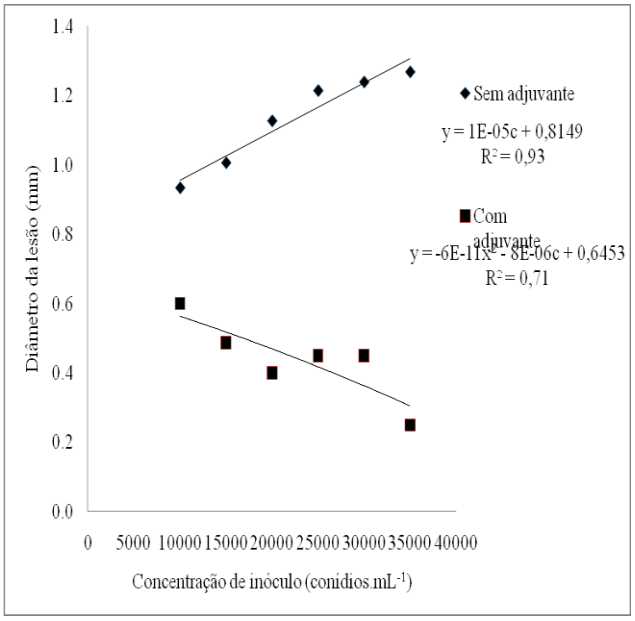

Figura 2– Efeito da concentração de inóculo (c) de *Cercospora sojina* sobre o diâmetro de lesões em folíolos de soja do cultivar NK Coker 7.5 RR em tratamentos sem e com adjuvante (2 gotas.L^{-1}). INTA Sáenz Peña. Argentina. 2010-2011.

Para o parâmetro diâmetro da lesão (mm), se observa na Figura 2 o mesmo efeito do uso do adjuvante no numero da lesão por folíolo.

Estas observações são importante considerar já que, de acordo com atribuído por Kidney (1980), altas densidades de inóculo são utilizadas, entre outros fatores, pode aumentar a taxa de crescimento da doença a tal ponto que um cultivar resistente poderá comportar-se como suscetível. Isso poderá dificultar a distinção de um cultivar resistente de outro com pouca resistência. Assim, muitas vezes, baixo nível de inoculo pode ser mais adequado para quantificar

a resistência das plantas, desde que esse nível seja capaz de causar doença (VAN DER PLANK, 1963).

Na infecção por *C. sojina*, não se encontrou na literatura consultada estudos sobre o efeito de diferentes concentrações de inóculo e do emprego de adjuvante na eficiência da infecção. No entanto, quando ao uso do adjuvante, mas não de doses crescentes, foi mencionado por Bisht & Sinclair (1985) e Yang & Weaver (2001).

4 CONCLUSÕES

A concentração de inóculo tem um aumento lineal na densidade e diâmetro das lesões por folíolo com o aumento da concentração de inoculo sem o uso de adjuvante.

Neste patossistema o uso de adjuvante teve um efeito negativo no tamanho e diâmetro das lesões de *C. sojina* em soja.

Com o uso de adjuvante o maior numero e diâmetro das lesões foi obtido com uma concentração de inóculo de $1x10^4$ conídios.mL^{-1}.

CAPÍTULO IV

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA, pH E POTENCIAL OSMÓTICO DO SUBSTRATO NA GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE *Cercospora sojina*

DIANA ERICA GÓMEZ[1] & ERLEI MELO REIS[2]

RESUMO- Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo e no Laboratório Regional de Patologia Vegetal de INTA Sáenz Peña, Chaco, República Argentina. O objetivo foi avaliar o efeito da temperatura e do tempo de exposição, do pH e do potencial osmótico do substrato na germinação dos conídios. Foram testadas as temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35°C durante 1, 3 e 4 horas de exposição, pH de 5, 6, 7 e 8 e potenciais osmóticos de 0; -0,6; -0,8 e -1 MPa. Uma suspensão de conídios foi vertida 700 µl em placas de petri contendo substrato ágar água. As placas foram incubadas numa câmara de crescimento com as temperaturas desejáveis. Ao finalizar o período de exposição foi adicionada uma solução de acetona + anilina azul para paralisar germinação e colorir os conídios. A determinação da germinação foi

[1] Engenheira Agrônoma, mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia e pesquisadora de Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria, INTA Sáenz Peña.

[2] Orientador, Engenheiro Agrônomo, Dr., professor da FAMV/PPGAgro/UPF. erleireis@tpo.com.br

realizada com um total de 100 conídios, quantificando os germinados ao microscópio óptico com magnitude de 200 vezes. A temperatura ótima para a germinação dos conídios de *C. sojina* foi de 25°C. O efeito positivo do pH foi obtido nos valores de 5,9; 6 e 6,1 e no potencial osmótico -1Mpa. Os dados foram submetidos a análise da regressão e de variância.

Palavras-chave: tempo de exposição, mancha olho-de-rã, *Glycine max*.

EFFECT OF TEMPERATURE, pH AND OSMOTIC POTENTIAL OF THE SUBSTRATE IN THE GERMINATION OF *Cercospora sojina* CONIDIA

DIANA ERICA GÓMEZ[1] & ERLEI MELO REIS[2]

ABSTRACT - The experiments were conducted at the Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Passo Fundo and the Regional Laboratory of Plant Pathology INTA Saenz Peña, Chaco, Argentina. The objective was to evaluate the effect of temperature and exposure time, pH and osmotic potential of the substrate on conidial germination. Temperatures of 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 35 ° C for 1, 3 and 4 hours of exposure, pH of 5, 6, 7 and 8 and osmotic potentials of 0, -0, 6, -0.8 and -1 Mpa were tested. A spore suspension was poured into 700 µL in petri dishes containing water agar substrate. At the end of the exposure periods a solution of acetone + aniline blue was added to the plates to stop

germination and dye the conidia. The counts were performed on a total of 100 germinated conidia quantified under an optical microscope with a magnitude of 200 times. The optimum temperature for *C. sojina* conidia germination was 25°C. A positive effect of pH at 5.9, 6 and 6.1 and osmotic potential -1Mpa wered confirmed. The data were analyzed by regression analysis and analysis gives the variance.

Keywords: exposure time, frogeye leaf spot, *Glycine max.*

1 INTRODUÇÃO

Na cultura da soja ocorrem diversas doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides. Dentre as doenças causadas por fungos que ocorrem nos órgãos aéreos da soja, destaca-se a mancha olho-de-rã causada pelo fungo *Cercospora sojina* Hara.

Nas safras 2008/2009 e 2009/2010 esta doença causou epidemias severas na cultura da soja nas províncias de Córdoba e Santa Fé na Argentina manifestando-se com severidade foliar de 30-60% (CARMONA & SCANDIANI, 2009).

Este fungo imperfeito se reproduz por esporos assexuais chamados de conídios. Cada espécie de fungo requer uma temperatura ótima para o seu crescimento vegetativo e reprodutivo (ALFENAS & MAFIA, 2007).

De modo geral, a temperatura tem maior influência nas atividades do patógeno do que o teor de água no substrato e da umidade relativa do ar. Todas as fases do ciclo das relações patógeno-hospedeiro são influenciadas pela temperatura. No processo de

reprodução, a temperatura pode alterar tanto a velocidade de produção de esporos como a quantidade de propágulos formados (BEDENDO, 1995).

A importância de se determinar as exigências térmicas do microorganismo quando de seu cultivo *in vitro,* decorre do menor tempo necessário para a produção do inóculo requerido em trabalhos de pesquisa (ALFENAS & MAFIA, 2007). Semelhantemente a temperatura, o pH e potencial osmótico do substrato também tem efeito sobre a esporulação dos fungos.

Conforme Phillips (1999), os conídios de *C. sojina* germinam com temperaturas compreendidas na faixa entre 25-30°C, no tempo de uma hora quando na superfície dos folíolos.

O tubo germinativo é definido como uma hifa curta que cresce a partir do poro germinativo (abertura da parede do esporo) ou fenda germinativa (fissura longitudinal na parede do esporo) durante a germinação do esporo e que apresenta desenvolvimento contínuo em condições ambientais favoráveis formando uma hifa de maior comprimento. O tubo germinativo não apresenta ramificações. Quando estas se formam a estrutura é denominada de micélio. O conjunto de hifas representa o micélio (ULLOA & HANLIN, 2000).

A síntese de solutos em resposta ao estresse osmótico é uma estratégia de osmoregulação dos fungos. Os solutos trocam a concentração de solutos da célula para manter a turgencia celular e manter a atividade enzimática (JENNIGS & BURKE, 1990).

Os meios artificiais *in vitro* são uma ferramenta útil para o estudo da influencia dos fatores ambientais no processo germinativo dos conídios (CARZOLA PERFETTI, 2007).

Em testes *in vitro* os solutos mais utilizados para o estudo do efeito do potencial osmótico do substrato no crescimento dos fungos são NaCl, KCl e sacarose (CERVANTES-GARCIA et al, 2003).

Este trabalho foi conduzido com a finalidade de avaliar o efeito da temperatura, tempo de exposição, pH e potencial osmótico do substrato na germinação dos conídios de *C. sojina*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A primeira etapa deste trabalho foi realizada no Laboratório de Fitopatologia e casa-de- vegetação da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo-RS e a segunda no Laboratório Regional de Patologia Vegetal EEA INTA Sáenz Peña, Chaco, Argentina.

2.1 Influência da temperatura na germinação de conídios de *Cercospora sojina.*

O delineamento experimental usado foi em blocos ao acaso com quatro repetições para cada tratamento.

Foram testadas temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35°C durante 1, 3 e 4 horas de exposição.

A suspensão de conídios foi obtida com ajuda de um pincel e água destilada, raspando-se as placas de petri contendo colônias puras de *C. sojina*. A seguir preparou-se uma lâmina contendo 10 µl da suspensão e determinou-se ao microscópio ótico o

número de conídios germinados. Com auxílio de uma micropipeta, foram pipetados 700 µl da suspensão e colocados em 12 placas de petri contendo o meio ágar água para cada temperatura. As placas foram mantidas uma estufa do tipo Biological oxigen demand (BOD) durante 1, 3 e 4 horas. Uma vez completado o tempo desejado, as placas foram retiradas e adicionou-se 2 mL de uma solução de acetona + anilina azul para paralisar o crescimento do fungo e colorir os conídios. Este procedimento foi realizado duas vezes para cada tempo testado.

A determinação da germinação foi feita avaliando-se 100 conídios, quantificando os geminados no microscópio ótico (Olympus CX 31 em magnitude de 40 vezes). Considerou-se conídio germinado aquele que apresentava comprimento do tubo germinativo igual ou maior ao maior diâmetro do esporo (ZADOKS & SCHEIN, 1979).

Foto 1. Conídio não germinado.

Foto 2. Conídio germinado.

2.2 Influência do pH do substrato na germinação de conídios de *Cercospora sojina*

Neste experimento foi usado o meio ágar V-8, preparado segundo Tuite (1973), ajustando o pH com HCl 0,1 N ou NaOH 0,1 N antes da autoclavagem para os seguintes valores: 3, 4, 5, 6, 7 e 8, sendo o pH do meio ágar V-8 de 6,7 a 25°C±2.

O isolado de *C. sojina* utilizado foi fornecido pela Embrapa Soja. O preparo da suspensão, método de plaqueamento e as condições de incubação foram semelhantes ao ensaio anterior, mas avaliação foi realizada aos sete dias de incubação.

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

2.3 Influência do potencial osmótico do substrato ajustado com manitol e KCl na germinação de conídios de *Cercospora sojina.*

Para este ensaio foi utilizado o meio ágar V-8, ajustando o potencial osmótico com manitol ou KCl nas seguintes concentrações obtidas a partir dos dados de Coutinho (2001):

Potencial osmótico (MPa)	Manitol ($g.L^{-1}$)	KCl ($g.L^{-1}$)
0	0	0
-0,6	11,14	2,48
-0,8	14,86	3,34
-1,0	18,60	4,18

O isolado do fungo utilizado, o preparo da suspensão, método de plaqueamento, as avaliações e as condições de incubação foram semelhantes ao ensaio anterior.

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

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Influência da temperatura e tempo de exposição na germinação de conídios de *Cercospora sojina.*

Os resultados deste experimento demonstram que com aumento da temperatura houve incremento na porcentagem de germinação dos conídios (Figura 1).

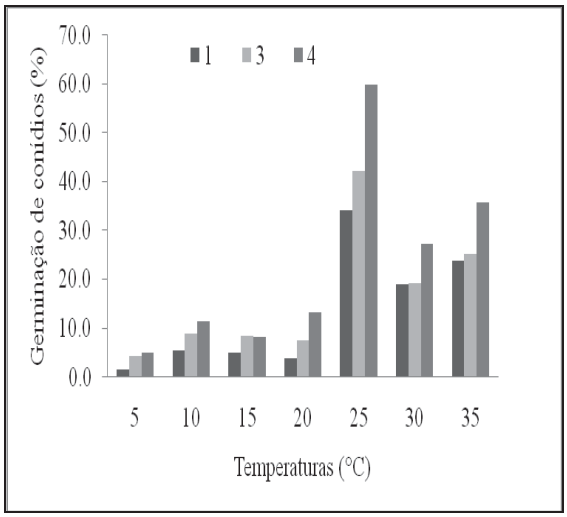

Figura 1- Relação da germinação de conídios de *Cercospora sojina* em função da temperatura, em três tempos de exposição em meio ágar V-8. Média de dois experimentos.

Os resultados observados na Figura 1 correspondem à média de dois experimentos.

Determinou-se que a temperatura de 25^{o}C foi a ótima para a germinação aumentando com o tempo de exposição. Este valor coincide ao relatado por Reis (1974).

De acordo com Cruz (2008), a temperatura de 25°C favorece o crescimento micelial para isolados do fungo amostrados nos EUA, mas os isolados adaptados à região norte podem ter temperaturas ótimas diferentes. Também descreve que o fungo *C. sojina* pode sobreviver até -4,2 °C saprofiticamente em tecidos naturalmente infectados.

Isto valida os resultados encontrados neste trabalho indicando que o fungo apresenta ampla faixa de temperatura na qual pode germinar.

3.2 Influência do pH do substrato na germinação de conídios de *Cercospora sojina.*

A germinação dos conídios de *C. sojina* neste experimento pode ser considerada baixa (20%) devido provavelmente ao curto tempo de exposição (4 h). O experimento teria que ser realizado novamente aumentando esse período. Mesmo assim se observa o efeito do pH do substrato ágar V-8 na germinação dos esporos (Figura 2).

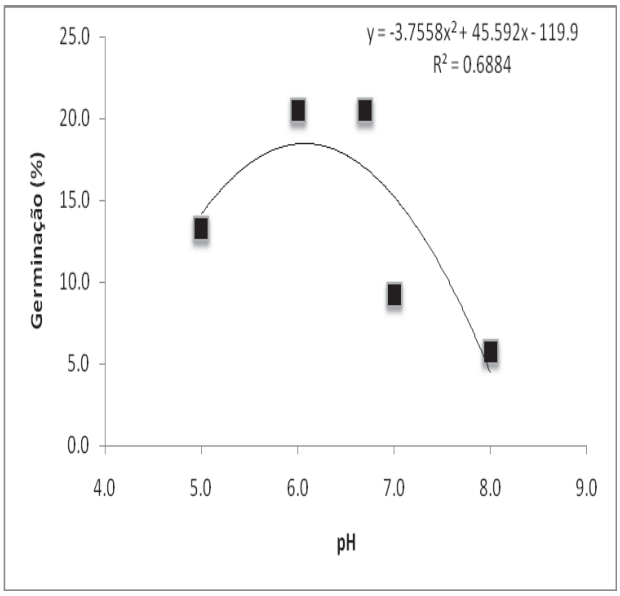

Figura 2- Germinação de conídios de *Cercospora sojina* em função do pH em meio de ágar V-8 a 25±2°C durante 4 h de exposição.

Com a equação o de regressão $y = -3,7558x^2+45,592x-119,9$ calculou-se que a germinação máxima ocorre com pH 5,9; 6 e 6,1.

3.3 Influência do potencial osmótico do substrato, ajustado com manitol e KCl na germinação de conídios de *Cercospora sojina.*

As pesquisas da influência do potencial osmótico do substrato na esporulação são escassas e em relação ao fungo *C. sojina* não se encontraram relatos sobre seu efeito.

No presente trabalho constatou-se o efeito positivo da redução do potencial osmótico do substrato sobre a germinação de conídios do fungo *C. sojina*.

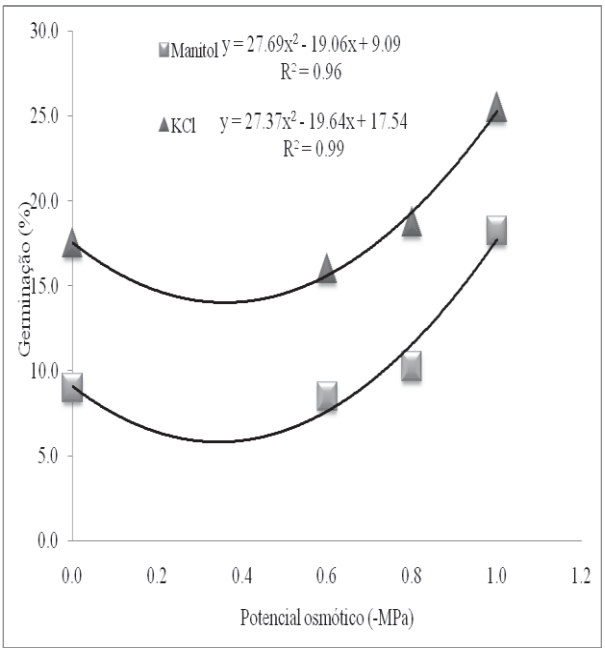

Figura 3- Relação da germinação de conídios de *Cercospora sojina* em função do potencial osmótico do meio de ágar V-8 ajustado com manitol e KCl a 25±2°C durante 4 h de exposição.

Uma redução no potencial osmótico (mais negativo) pode produzir um efeito tóxico sobre os conídios como ocorre com as plantas (CARZOLA PERFETTI, 2007 apud LERNER, 1985). No entanto, de acordo com a equação de regressão gerada, $y = 27,69x^2 - 19,06x+9,09$, o maior percentagem de germinação de conídios na presença de KCl ocorreu no potencial osmótico -1Mpa.

Por outro lado, quando o potencial foi ajustado com manitol, a maior germinação também ocorreu no potencial osmótico -1Mpa, porém em menor proporção do que com KCl ($y=27,37x^2 - 19,64x+17,54$).

Segundo relatos realizados por Subbarao et al., (1993) a redução do potencial osmótico pode provocar a redução do crescimento da colônia de *Fusarium moniliforme* Sheldon.

Resultados semelhantes foram relatados por Carzola Perfetti et al. (2007) com conídios do isolado LF14 de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, tendo obtido percentagens de germinação superior a 95% com altas concentrações de NaCl.

Segundo Méndez & Pérez (2006) este fato pode estar relacionado com a variabilidade do isolado, além de que pode estar envolvido um mecanismo de adaptação ao substrato para sobreviver como saprófito ou em estado latente nos tecidos do hospedeiro.

4 CONCLUSÕES

A germinação dos conídios *C. sojina* de foi maximizada a 25^{o}C temperatura, sendo maior com 4 h de exposição.

A germinação máxima ocorre com pH 5,9; 6 e 6,1e no potencial osmótico -1Mpa na presença de KCl no substrato.

CAPITULO V

REAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA À *Cercospora sojina*

DIANA ERICA GÓMEZ[1] & ERLEI MELO REIS[2]

RESUMO - O objetivo de este trabalho foi avaliar a reação de alguns cultivares de soja de ciclo de maturação VII-VIII cultivados na região norte de Argentina à *Cercospora sojina*. O experimento foi realizado no Laboratório Regional de Patologia Vegetal da Estação Experimental INTA Sáenz Peña, Argentina. Foram avaliados os cultivares NK Coker, 7.5 RR, NA 8009 RG, Tob 7.800 RR, NA8010 RG, NA 8413 RG e Munasqa RG. As plantas cultivadas em vaso foram inoculadas com conídios de *C. sojina* suspensos em água destilada + 2 gotas/litro adjuvante (Tween 20-Sinth). A inoculação foi feita com inoculo proveniente de folíolos infectados de soja de Argentina, no segundo trifólio completamente expandido por aspersão do inóculo permanecendo posteriormente em câmara climatizada a 25± 2°C com 12 h de luz por 15 dias. As avaliações foram realizadas pelo número e diâmetro de lesões por folíolo, a severidade estimada e pelo sistema classificatório do tipo de reação. Todos os cultivares foram resistentes para os critérios número de lesão, severidade

[1] Engenheira Agrônoma, mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia e pesquisadora de Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria, INTA Sáenz Peña.

[2] Orientador, Engenheiro Agrônomo, Dr., professor da FAMV/PPGAgro/UPF. erleisreis@tpo.com.br

estimada e tipo de reação. O cultivar NK Coker 7.5 RR apresentou diferença estatísticas dos demais cultivares para a variável diâmetro da lesão.

Palavras-chave: Olho-de-rã, resistência, lesão, *Glycine max*

REACTION OF SOYBEAN CULTIVARS

DIANA ERICA GÓMEZ[1] & ERLEI MELO REIS[2]

ABSTRACT- One of the fungi that the soybean affects is *C. sojina* that it causes the disease frogeye leaf spot. Use of resistant cultivars is one method have reduced the incidence of the disease. The experiments were realized in the Laboratory of Phytopathology of the Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine of the University of Passo Fundo e Laboratory Regional of Pathology Vegetal INTA Sáenz Peña, Chaco, Argentina. The objective of this work was to evaluate to resistance cultivar in maturity groups VII and VIII of soybean cultivated in the north region of Argentinean: NK Coker, 7.5 RR, NA 8009 RG, Tob 7.800 RR, NA8010 RG, NA 8413 RG e Munasqa RG. A suspension of conidia + 2 drops/l adjuvant (Tween 20-Sinth) was inoculated. The inoculation was realized in the second trefoil completely expanded by aspersion remaining in conditioned of growth chamber to 25± 2°C with 12 h of light by 15 day. The evaluations were realized measuring number and diameter of spot by leave, using a scale of estimated severity and the system of classification of the type of reaction. All the will cultivate are resistant

for the criteria: number of spot, scale of estimated severity and type of reaction. Contrary, the cultivar NK Coker 7.5 RR present statistical differences with the others cultivars for the variables diameter of the spot.

Key words: frogeye leaf spot, resistance, lesion, *Glycine max*

1 INTRODUÇÃO

A cultura de soja [*Glycine max* L. (Merr.)] é afetada por doenças bióticas que incluem as causadas por fungos, bactérias, virus, fitoplasmas, espiroplasmas e nematóides. Além disso, fatores abióticos causam desordens, tais como as condições ambientais, nutricionais, entro outros.

Um dos fungos que causa doença em soja é *Cercospora sojina* Hara, agente causal da doença mancha olho-de-rã.

O manejo da doença envolve a utilização de cultivares resistentes, sementes livres do patógeno e a rotação de culturas (PHILLIPS, 1999).

Athow & Probst (1952) reportaram que a resistência conferida para a doença é conferida pela presença de genes simples, dominantes.

Embora o controle de *C. sojina* seja feito através do uso de resistência genética, o fungo apresenta grande variabilidade e cultivares resistentes tornam-se suscetíveis com o desenvolvimento de novas raças (YORINORI, 1989).

Levantamentos realizados por Robinet et al. (2001) nos ensaios da Rede de avaliação de Cultivares de Soja Região Norte Argentino (RECSO) de INTA, na safra 1999/2000 determinaram a presença da doença em diferentes cultivares e reportaram a mesma com porcentagem variáveis de plantas afetadas.

Diferentes critérios são utilizados para avaliar a resistência de cultivares: numero de lesões, tamanho da lesão, área afetada, o que dificulta a separação de genótipos em resistentes e suscetíveis (YANG, 2001).

Em avaliações realizadas por Martins Filho et al. (2002), foram utilizadas os seguintes métodos: nota para infecção (NI) utilizando escalas visuais, número de lesões por folíolo (NLF), diâmetro médio (DLM), número de lesões por cm^2 (NLC), porcentagem da área foliar lesionada (PAFL) e índice da doença (ID).

Por outro lado, Distéfano et al. (2009) propuseram uma escala de severidade estimada: Grau 1= sem sintomas, Grau 2=<1-5% e 1-25% das folhas com manchas, Grau 3=6-15% e 100% das folhas com manchas, Grau 4=16-35% e 100% das folhas com manchas, Grau 5= 36-50% e100% das folhas com manchas e Grau 6=>50% 100% das folhas com manchas.

Diferentemente, Yorinori & Klingelfuss (1999) para determinar o tipo de reação dos cultivares empregaram os seguintes critérios: R= Resistente: NI (Nível de reação) =0-2 e TL (tamanho da lesão)=1 mm; I= Intermediaria: NI=3 e TL1-3 mm; S=Suscetível:NI=4-5 e TL=2-5 mm.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a reação de cultivares de soja de ciclo de maturação longo (VII-VIII)

cultivados na região norte de Argentina comparando métodos para classificar a reação de genótipos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em câmara climatizada no Laboratório Regional de Patologia Vegetal da Estação Experimental INTA Sáenz Peña, Chaco, República Argentina.

2.1 Cultivo das plantas

As plantas de soja foram cultivadas em vasos com cinco plantas por recipiente. Foram testados cultivares de soja do grupo de maturação 7-8, os mais cultivados na região norte de Argentina: NK Coker 7.5 RR, NA 8009 RG, Tob 7.800 RR, NA8010 RG, NA 8413 RG e Munasqa RG.

2.2 Preparo da suspensão de inóculo

A partir de colônias puras do fungo *C. sojina* foi preparada uma suspensão de conídios na concentração de 40.000 conidios.mL^{-1} em água destilada + 2 gotas/litro adjuvante (Tween 20).

2.3 Inoculação das plantas

A inoculação das plantas foi feita quando estavam no segundo trifólio completamente expandido com a concentração de 40.000 conídios.ml^{-1} utilizando um aspersor manual.

2.4 Incubação

As plantas foram cobertas com sacos plásticos fechados hermeticamente a fim de proporcionar uma câmara úmida por 48 horas. Após, os sacos foram retirados e a folhagem mantida úmida até o surgimento dos sintomas.

As plantas permaneceram em câmara climatizada com temperatura constante de 25°C± 2°C com 12 horas de luz por 15 dias.

2.5 Avaliações

Para a avaliação da reação foram usados quatro critérios: número de lesões por folíolo, diâmetro das lesões, severidade estimada usando a escala de severidade proposta por Distéfano et. al (2009) (Fig. 1) e o tipo de reação de acordo com o sugerido por Yorinori & Klingelfuss (1999) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação dos tipos de reações da soja proposta por Yorinori & Klingelfuss (1999).

Tipo de reação	Nível de reação	Tamanho da lesão (mm)
Resistente	0-2	1
Intermediária	3	3
Suscetível	4-5	2-5

Foram avaliadas as lesões.folíolo^{-1} de todos os folíolos com sintomas. Para a medida do tamanho de lesão foi utilizado um paquímetro digital Mitutoyo Digimatic Caliper.

O delineamento experimental foi blocos ao acaso.Os dados foram submetidos a análise da variância e as médias comparadas por Tukey ao nível de 5%.

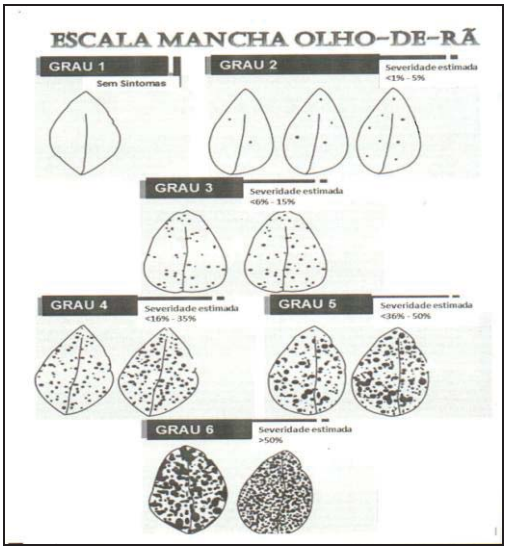

Figura 1- Escala de severidade estimada diagramática para avaliação da reação de cultivares de soja à *Cercospora sojina* proposta por Distéfano et al. (2009) e modificada por Gómez (2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se que nenhum dos cultivares testados foi imune à infecção por *C. sojina*.

Tabela 2 - Reação de cultivares de soja à inoculação de *Cercospora sojina* em câmara climatizada. INTA Sáenz Peña, Chaco. Argentina. 2010-2011

	Lesão por folíolo (nº)	Diâmetro da lesão por folíolo (mm)	Nível de Reação (*)	Severidade Estimada (**)
Cultivares	Médias	Médias		
NK Coker 7.5 RR	5,57 a	2,7 a	R	10%
NA 8009 RG	3,72 a	0,9 b	R	10%
Tob 7.800 RR	5,34 a	1,1 b	R	10%
NA 8010 RG	6,48 a	1,3 b	R	10%
NA 8413 RG	4,41 a	1,4 b	R	10%
Munasqa RR	8,88 a	1,2 b	R	10%
CV%	**36,27%**	**14,0%**		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade do erro. Dados transformados com a fórmula Raiz quadrada.
(*) Yorinori & Klingelfuss (1999)
(**) Distéfano et al. (2009)

Analisando os cultivares pelos métodos utilizados, pode-ser observar na Tabela 2 que os seis cultivares não apresentaram diferenças estatísticas quanto a densidade de lesões.

Quanto ao diâmetro (mm) da lesão o cultivar NK Coker 7.5 RR apresentou as maiores lesões, diferindo estatisticamente das demais (Figura 1).

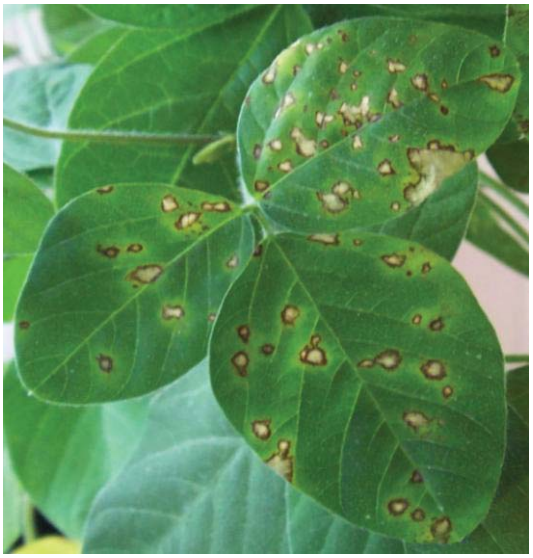

Figura 1. Sintomas da mancha foliar olho-de-rã
no cultivar NK Coker 7.8 RR.

Analisando os dados pela severidade estimada, pode se observar que todos os cultivares apresentaram a mesma intensidade da doença. Estes cultivares ainda não foram avaliados para a resistência da mancha olho-de-rã pelo método científico. Contudo, Yang & Weaver (2001) empregando a severidade estimada em avaliações de cultivares do grupo de maturação VI e VII encontraram 393 e 267 cultivares resistentes de um total de 1024 e 662 cultivares dos grupos VI e VII respectivamente.

Pelo tipo de reação proposto por Yorinori & Klingelfuss (1999), todos os cultivares apresentaram reação resistente. Esta

proposta não representa um critério objetivo e prático para avaliação dos cultivares.

De acordo com a relatado por Ito et al. (1985), os cultivares Cristalina e IAC-11 são considerados resistentes, IAC-10 é suscetível e IAC-8 intermediário. Provavelmente a resistência observada no cultivar Cristalina seja proveniente do cultivar Davis, assinalado como resistente às quatro raças de *C. sojina* existentes nos EUA por ROOS (1968).

De acordo com observado, a doença se encontra sob controle na região em relação a este cultivares que são resistentes, e que devido as condições ambientais desfavoráveis ao desenvolvimento da doença mesmo que o inóculo esteja presente não resulta em epidemias.

Na província de Córdoba as condições são propicias ao desenvolvimento do triângulo da doença e, portanto é necessário aprofundar pesquisas que envolvam a produção de cultivares resistentes ao fungo *C. sojina.*

4 CONCLUSÕES

Os cultivares testados mostraram-se resistentes quando avaliados pelos critérios, número de lesões por folíolo, severidade estimada e tipo de reação.

O cultivar NK Coker 7.5 RR apresentou diferenças dos demais cultivares quando foi avaliada pelo diâmetro das lesões.

Nenhum cultivar foi imune.

O método de número e diâmetro de lesões apresenta dificuldades em sua utilização quando forem avaliados experimentos com numerosos tratamentos.

5 CONSIDERACÕES FINAIS

Conhecendo a resistência que o cultivar Davis apresenta para todas as raças do patógeno *C. sojina* próximos experimentos poderiam ser realizados com o uso de este cultivar como testemunha resistente.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AGUIRRE, N.; VILLAMIZAR, R. L.; ESPINEL, C. C.; COTES P. A. M. Efecto del pH y de la actividad de agua sobre el desarrollo de *Nomuraea rileyi* (Hyphomycetes). *Revista Colombiana Entomologia*, v. 35, n. 2. 2009. Disponível em: http://www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?pid=S0120 04882009000200005&script=sci_arttext. Acceso em: 15 de abril de 2011.

AGRIOS, G. N. *Plant Pathology*. 5th ed. Oxford: Academic, Press, 2005, 948 p.

ALEXOPOULUS, C.J.; MIMS, C.W; BLACKWELL, M. *Introductory Micology*. Jonn Wiley & Sons. 4ª. Edition. EUA. 1996

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. *Métodos em Fitopatologia*, Ed. UFV, Viçosa, 382 p. 2007.

AKEM, C. N.; DASHIELL, K. E. Effect of planting date on severity of frogeye leaf spot and grain yield of soybean. *Crop Protection*, Oxford, v.13, n. 8, p. 607-610. 1992.

ATHOW, K. L.; PROBST, A. H. The inheritance of resistance to frogeye leaf spot of soybeans. *Phytopathology,* v. 42, p.660–662. 1952.

ATHOW, K. L., PROBST, A. H., KARTZMAN, C. P., LAVIOLETTE, F. A. A newly identified physiological race of *Cercospora sojina* on soybean. *Phytopathology*, v. 52, p. 712–714. 1962.

BAKER, W. A.; WEAVER, D. B.; QIU, J.; PACE, P. F. Genetic analysis of frogeye leaf spot resistance in PI54610 and Peking soybean. *Crop Science*, v. 39, p.1021–1025. 1999.

BEDENDO, I. P. *Ambiente e doença*. In: Manual de Fitopatologia. 3ra. Ed., São Paulo, p. 383. 1995.

BISHT, V.S.; SINCLAIR, J.B. Effect of Cercos*pora sojina* and *Phomopsis sojae* alone or in combination on seed quality and yield of soybeans. *Plant Disease*, v. 69, p. 436–439. 1985.

BONACIC KRESIC, M. R. DE; CAMPAGNAC, N. A. Contribución al conocimiento de las enfermedades sobre los distintos cultivos en el noreste argentino. *Misceláneas Nº 7*, EEA INTA Sáenz Peña-Chaco, 1982.

CARMONA, M.; SCANDIANI, M.; LUQUE, A. 2009. Severe Outbreaks of Soybean Frogeye Leaf Spot Caused by *Cercospora sojina* in the Pampean Region, Argentina. *Diseases Notes*, v. 93: p. 9-966, set. 2009.

CARMONA, M.; SCANDIANI, M. Epidemias de la mancha ojo de rana en la Región Pampeana: Caracterización y manejo. In: XVII CONGRESO NACIONAL DE AAPRESID, 2009. Rosario, Santa Fe. Disponível em: <http://agro.fauba.info/files/carmona_aapresid.pdf>. Acesso em: 16 de set. 2009.

CARVALHO, J. C. B. Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Lavras: UFLA, *Dissertação Mestrado*. 1999. 98p.

CARZOLA PERFETTI, D.J.; MORALES MORENO, P.; ACOSTA QUINTERO, M. E. Efectos de gradientes térmicos, salinos y pH sobre la germinación in vitro de un aislado nativo de *Beauveria bassiana* (bálsamo) Vuillemin, patógeno para *Rhodnius prolixus* y *Triatoma maculata*. Revista Científica, FCV-LUZ, v. 17, n. 6, p. 627 - 631, 2007.

CASELA, C. R.; LUZZARDI, C. G.; GASTAL, M. F. C. Mancha "olho-de-rã" *Cercospora sojina* Hara, em soja [*Glycine max* (L.) Merill]*:* estudo de variabilidade do patógeno. In: I SEMINARIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA. Londrina, P.R. *Anais*..., Londrina: CNPSO/Embrapa, 1979, v. 2, p.139-143.

CASELA, C. R.; BRANDÓN, N.; GASTAL, M. F. C. Raças fisiológicas de *Cercospora sojina* Hara, agente causal da mancha olho-de-rã em soja (*Glycine max* (L.)Merril). In: II SEMINÁRIO

NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA. Brasília, D. F. *Anais*....Londrina: CNPSO/Embrapa, 1982, p. 255-262.

CERVANTES-GARCÍA, D.; PADILLA-RAMÍREZ, SAÚ, J.; SIMPSON, J.; MAYEK-PÉREZ, N. Osmotic Potential Effects on *In Vitro* Growth, Morphology and Pathogenicity of *Macrophomina phaseolina. Journal of Phytopathology*, v. 151, n. 7-8, p. 456–462, 2003.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB) 2009 – Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2010/2011 – Quarto levantamento – janeiro 2011. Disponível em: http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1028&t=2. Acceso em: 5 de abril de 2011.

CORDEIRO, A. C. C. *Herança da resistência da soja (Glycine max (L.) Merrill), à Cercospora sojina Hara, isolado de São Gotardo, Minas Gerais*. 1986. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil. 1986.

CORDEIRO, A. C.; SEDIYAMA, T.; GOMES, J. L; SEDIYAMA, C. S.; REIS, M. S. Herança da resistência da soja a *Cercospora sojina* Hara, isolado de São Gotardo, Minas Gerais. *Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 27, n. 7, p. 1035-1042. 1992.

CORTÉS, V. G. *Introducción a la microbiología*, 2da. Ed. UNED, 2005, 243 p.

COUTINHO, W. M.; MACHADO, J. C.; VIEIRA, M. G. G. C.; GUIMARÃES,R. M.; FERREIRA, D. F. *Revista Brasileira de Sementes*, vol. 23, n 2, p.127-135, 2001.

CRUZ, C. D. *Impact of foliar diseases on soybean in Ohio: frogeye leaf spot and septoria brown spot.* Dissertação (Mestrado da Ciência), Escola de Graduados da Universidade Estadual de Ohio, Estados Unidos, 2008.

DASHIELL, K. E.; AKEM, C. N. Yield losses in soybean from frogeye leaf spot caused by *Cercospora sojina*. *Crop Protection,* v.10. p. 465-468. 1991.

DAVIS, D. J.; BURLAK, C.; MONEY, N. P. Osmotic pressure of fungal compatible osmolytes. *Mycological Research,* 2000, v 104, n 7, p 800-804.

DAUB, M. E.; CHUNG, K.R. Cercosporin: A Photoactivated Toxin in Plant Disease. *APSnet Feature*, 2007. Disponível em: http://www.apsnet.org/online/feature/cercosporin/. Acceso em: 13 de julho de 2010.

DISTÉFANO, S. G.; LENZI, L.; GADBÁN, L. C.; FUENTES, F. Evaluación de cultivares de soja frente a "mancha ojo de rana" (*Cercospora sojina* Hara). INTA EEA Marcos Juárez. 2009. Disponível em: http://www.inta.gov.ar/mjuarez/info/documentos/soja/morsoja10res.htm

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E.; BURMOOD, D. T.; PENNINGTON, J. S. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merril. *Crop Science*, v11, n 6, p 929-931. 1971.

FERNANDEZ, M. R. *Manual para laboratório de fitopatologia*. Passo Fundo. Embrapa-CNTP. Doc. 1993.

FORMENTO A. N.; DE SOUZA J.; ZANOTTI F. Comportamiento de cultivares de soja a mancha ojo de rana (*Cercospora sojina*) en Entre Ríos. Ciclo agrícola 2008/09. Actualización Técnica SOJA - *Serie Extensión Nº 56*, EEA INTA Paraná. Disponível em: http://www.inta.gov.ar/parana/info/biblioteca/publicaciones/Serie_Ext_56.pdf. Acceso em: 13 de junho de 2010.

FUMIKO, M.; COELHO, M. A.; DUDIENAS, C.; VILA, J. C.; BULISANI, E. A. Incidência de *Cercospora sojina* Hara em cultivares de soja. In: XVII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE FITOPATOLOGIA, São Paulo. 1984.

GILCHRIST, L.; FUENTES DÁVILA, G.; MARTINEZ-CANO, C.; LOPEZ-ATILANO, R. M.; DUVEILLER, E.; SINGH, R. P.; HERNRY, M.; GARCIA, I. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. 2da. Ed., CIMMYT, México, 2005.

GRAVINA, G. A; SEDIYAMA, C. S.; MARTINS FILHO, S.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G.; CRUZ, C. D. Multivariate analysis of combining ability for soybean resistance to *Cercospora sojina* Hara. *Genetics and Molecular Biology*, v.27, n. 3, p. 395-399. 2004.

HARA, K. Spot disease of soybean. Agric. Country, v. 9, p. 28. 1915.

HUO, H.; MA, S. M.; LU, G. Z.. The study of *Cercospora sojina* Hara races in Heilongjiang Province. (In Chinese.) *Soybean Science*, v. 7, p. 315–318. 1988.

HYMOWITZ, T.; HARLAN, J. R. Introduction of soybean to North America by Samuel Bowen in 1765 *Glycine max*.. *Economic Botany,* 1983, v. 37, p.371-379.

ITO, M. F.; MIRANDA, M. A. C.; DUDIENAS, C., PEREIRA, J. C. V. N., BULISANI, E. A. Incidência de *Cercospora sojina* Hara em cultivares de soja. *Bragantia, Campinas,* v. 44, n 1, p. 223-227. 1985.

JENNINGS, D. H.; BURKE, R. M. Compatible solutes the mycological dimension and their role as physiological buffering agents. *New Phytologist*, v. 117, p. 277-283. 1990.

KIDNEY, B. Quantifying expression of resistance to Uromyces in Phaseolus. *Tese de Mestrado.* University of Flórida. Local. P. 92. 1980.

MARTINS FILHO, S.; GRAVINA, G. A.; SEDIYAMA, C. S. Controle genético da resistência a raça 4 de *Cercospora sojina. Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 37, n.12, p.1727-1733. 2002.

MELCHERS, L. E. Diseases of cereal and forage crops in the United States in 1924. *Plant Disease*. Rep. 40 (suppl.), p.186. 1925.

MENDEZ, K. L.; PÉREZ, N. M. Potencial osmótico variable en el crecimiento *in vitro* y la patogenicidad en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de *Fusarium* sp. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 2006, v 24, n 2, p. 88-97.

MENGISTU, A.; KURTZWEIL, N. C.; GRAU, C.R. First Report of Frogeye Leaf Spot (*Cercospora sojina*) in Wisconsin. *Diseases Notes*, v. 86, n. 11. 2002.

MIAN, M. A. R.; BOERMA, H. R.; PHILLIPS, D. V.; KENTY, M. M.; SHANNON, G.; SHIPE, E. R.; SOFFES BLOUNT, A. R.; WEAVER, D. B. Performance of frogeye leaf spot–resistant and –susceptible near-isolines of soybean. *Plant Disease*, v. 82, p. 1017-1021. 1998.

MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERIA Y PESCA DE LA NACIÓN (MAGyP). 2011. http://www.minagri.gob.ar/SAGPyA/agricultura/cultivos_en_la_argentina/01-mapa_principales_cultivos/index.php?PHPSESSID=56e0f8019fa648a70cfff79da5db3886: Acceso 7 de abril de 2011.

MISSAOUI, A.M.; PHILLIPS, D.V.; BOERMA, H.R. DNA marker analysis of 'Davis' soybean and its descendents for the *Rcs*3 gene conferring resistance to *Cercospora sojina*. *Crop Science*, v. 47, p. 1263–1270. 2007.

PACE, P.F.; WEAVER, D.B.; PLOPER, L.D. Additional genes for resistance to frogeye leaf spot race 5 in soybean. *Crop Science*, v. 33, p.1144–1145. 1993.

PHILLIPS, D.V.; BOERMA, H. R. *Cercospora sojina* race 5: A threat to soybean in the southeastern United States. *Phytopathology*, v. 71, p. 334–336. 1981.

PHILLIPS, D.V.; BOERMA, H. R. Two genes for resistance to race 5 of *Cercospora sojina* in soybeans. *Phytopathology*, v. 72, p.764–766. 1982.

PHILLIPS, D.V. *Frogeye leaf spot*. p. 20–21. *In* G.L. Hartman, J.B.Sinclair, and J.C. Rupe (ed.) Compendium of soybean diseases. 4th ed. American Phytopathological Soc., St. Paul, MN. 1999.

PLOPER, L. D.; GONZÁLES, V.; GÁLVEZ, M. R.; DEVANI, M. R.; LEDESMA, F.; ZAMORANO, M. A. Frogeye Leaf f Soybean caused by *Cercospora sojina* in Northwestern Argentina. *Plant Disease*, v. 85, n.7, p. 801. 2001.

ROBINET, H.; LIZONDO, M.; ZELARAYÁN, E.; CHAVARRÍA, A. Mancha Ojo de Rana de la Soja (1era Parte). INTA-EEA Famaillá. *Horizonte Agroalimentario*, n. 3, p. 20-23. 2001.

RED NACIONAL DE EVALUACIÓN DE CULTIVARES DE SOJA (RECSO) - Resultados de la Red Nacional de Evaluación de Cultivares de Soja en la Región Norte (I), Pampeana Norte (II) y Pampeana Sur (III). Campaña 2009/10**.** Convenio de Vinculación Tecnológica INTA/ASA, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - Estación Experimental Marcos Juárez. 2010.

REIS, E. M. Efeito da concentração de inoculo de *Colletotrichum dematium* f. *truncata* (Schw.) von ARX na reação de variedades de soja (*Glycine max*) (L.) (Merr.). *Dissertação de Mestrado*. Piracicaba, São Paulo, 1973.

REIS, E. M.; KIMATI, H. Nota sobre a ocorrência de *Cercospora sojina* Hara, causando a mancha foliar "olho-de-rã" em soja, no Rio Grande do Sul. *Revista O solo*, v. 2, UPS. São Paulo, Brasil. 1973.

REIS, E. M. A Mancha "olho-de-rã" em soja. *Revista Instituto Rio Grandense do arroz, Lavoura Arrozeira*, v. 279, p. 4-8. 1974.

ROMO, D. C. *Prácticas de Patologia Vegetal*. Secretariado de Publicaciones, Murcia, 54 p. 1990.

ROSS, J.T. Additional physiologic races of *Cercospora sojina* on soybean in North Carolina. *Phytopathology*, v.58, p.708–709. 1968.

SCANDIANI, M. M.; FERRI, M.; CARMONA, M. A.; RUBERTI, D. S.; TARTABINI, M.; LUQUE, A. Evaluación de fungicidas para el control de *Cercospora sojina* Hara en semillas de soja. In: XIII JORNADAS FITOSANITARIAS ARGENTINAS, 2009. Santiago del Estero.

SHIRAI, K.; HORITA, H.; TANAKA, F.; TANII, A.; MINO, Y. A new Race of *Cercospora sojina* in Hokkaido. *Annuals Phytopathological Society of Japan*, v. 60, p. 694-697. 1994.

SUBBARAO, K. V., MICHAILIDES, T. J., MORGAN, D. P. Effects of Osmotic Potential and Temperature on Growth of Two Pathogens of Figs and a Biocontrol Agent. The American Phytopathological Society. *Phytopathology,* 1993, v 83, p.1454-1459.

TUITE, J. *Plant pathological Methods*. Burges Publishing Co. 1973, p. 73.

ULLOA, M. & R.T. HANLIN. 2000. *Illustrated Dictionary of Mycology*. The American Phytopathological Society. 448 pp.

VAN DER PLANK, J.C. *Principles of plant infection*. New York. Academic Press, p. 216, 1975

VEIGA, P. *Cercospora sojina Hara: obtenção de inoculo, inoculação e avaliação da resistência em soja [Glycine max (L.) Merril]*. 1973. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

WRATHER, J.A.; ANDERSON, T.R.; ARSYAD, D.M.; TAN, Y.; PLOPER, L.D.; PORTA-PUGLIA, A.; RAM, H.H.; YORINORI, J.T. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean producing countries in 1998. *Canadian Journal Plant Pathology.* 23:115-121. 2001.

YANG, W., WEAVER, D. B. Resistance to frogeye leaf spot in maturity groups VI and VII of soybean germoplasm. *Crop Science*. 41:549–552. 2001.

YORINORI, J. T. *Doenças*. Ministério da Agricultura. IPEAME. Soja no Paraná. 1971. (Circ. N° 9).

YORINORI, J. T; GARCIA, A. Danos causados por *Cercospora sojina* Hara nas sementes do cultivar de soja Bragg. (Resumo) *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 2, p-. 107-108, 1977.

YORINORI, J. T. Identificação de raças de *Cercospora sojina* (mancha "olho-de-rã") e distribuição geográfica. Resultados da pesquisa de soja 1988/89. CNPSO/EMBRAPA. Londrina, v. 43 p. 405. 1989.

YORINORI, J. T. *Management of foliar fungal diseases in soybean in Brazil.* In: COPPING, L. G.; GREEN, M. B.; REES, R. T. (Ed.). Pest management in soybean. London: Elsevier Applied Science, p. 185-193, 1992.

YORINORI, J. T. Reação das cultivares brasileiras de soja a nova raça CS-23 de *Cercospora sojina*. In: XXX CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, Poços de Caldas, 1997, p.518.

YORINORI, J.T; KLINGELFUSS, L. H. Novas raças de *Cercospora sojina* em soja. *Fitopatologia Brasileira*, v.24, n.4, p.509-512. 1999.

ZOU, J., DONG, W., YANG, Q., CAO, Y., CHEN, S. Inheritance of resistance to race 7 of *Cercospora sojina* in soybeans and RAPD tagging of the resistance gene. *Chinese Science Bulletin*, v. 44, p.452–455. 1999.