

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

**PATOGENICIDADE, ESPORULAÇÃO E
INTERAÇÃO ENTRE TEMPERATURA E PERÍODO
DE MOLHAMENTO FOLIAR NA INTENSIDADE DA
MANCHA FOLIAR “OLHO-DE-RÃ” EM SOJA**

JULIANE NICOLODI CAMERA

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, fevereiro de 2012

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

**PATOGENICIDADE, ESPORULAÇÃO E
INTERAÇÃO ENTRE TEMPERATURA E PERÍODO
DE MOLHAMENTO FOLIAR NA INTENSIDADE DA
MANCHA FOLIAR “OLHO-DE-RÃ” EM SOJA**

JULIANE NICOLODI CAMERA

Orientador: Profa. Dra. Carolina Cardoso Deuner

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, fevereiro de 2012.



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



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.

"Patogenicidade e esporulação de *Cercospora sojina* e interação entre temperatura e período de molhamento foliar na intensidade da mancha foliar "olho-de-rã" em soja"

Elaborada por

JULIANE NICLODI CAMERA

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

Aprovada em: 29/02/2012
Pela Comissão Examinadora

Dra. Carolina Cardoso Deuner
Presidente da Comissão Examinadora
Orientadora

Dr. Vilson Antonio Klein
Coord. Prog. Pós-Graduação em Agronomia

Dr. Erlei Melo Reis
FAMV/UPF

Dr. Hélio Carlos Rocha
Diretor FAMV

Dra. Claudine Dinali Santos Seixas
Embrapa Soja

CIP – Catalogação na Publicação

C182pCamera, Juliane Nicolodi

Patogenicidade, esporulação e interação entre temperatura e período de molhamento foliar na intensidade da mancha foliar “olho-de-rã” em soja / Juliane NicolodiCamera. – 2012.
101f.: il., color.; 25 cm.

Orientador: Profa. Dra. Carolina Cardoso Deuner.
Dissertação (Mestrado em Agronomia) –
Universidade de Passo Fundo, 2012.

1.Soja-Doenças e pragas.
2.Fitopatologia.3.Produtividade agrícola.I. Deuner,
Carolina Cardoso, orientador. II. Título.

CDU:632.4

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

"Leva tempo para se ter sucesso porque o sucesso é meramente a recompensa natural de se usar o tempo para se fazer bem qualquer coisa."

Joseph Ross

AGRADECIMENTOS

A Deus!

Agradeço à aquele, que me permitiu tudo isso, ao longo de toda a minha vida, e, não somente nestes anos, é a Ele que dirijo minha maior gratidão. Deus, mais do que me criar, deu propósito à minha vida. Vem dele tudo o que sou, o que tenho e o que espero. Tu és o maior mestre, que uma pessoa pode conhecer e reconhecer.

obrigada!

A família!

Ao meu pai Celso, minha Mãe Rosane e a minha irmã Jaqueline pela ajuda, paciência e incentivo, durante esses dois anos,

obrigada!

A professora Carolina Cardoso Deuner!

Por seu apoio, ensinamentos e pela primorosa orientação prestada,

obrigada!

Aos meus amigos!

Camila Ranzi, Aveline Avozani, Eduardo Viana, Rosane Baldiga
Tonin, Diana Erica Gomes, Anderson Danelli, Sandra Zoldan, Elaine
Deunner, Camila Turra, Roberto de Rossi, Antonio Sergio Ferreira,
Ricardo Brustolin, Andréia Reis, Marília, Camila Waden, Ana
Pedersen, Valéria pelo carinho e auxílio na condução dos
experimentos
obrigada!

A UPF e ao PPGAgro!

Pela concessão da bolsa de estudos e pela oportunidade de realizar este
curso,
obrigada!

Aos professores e a banca!

Carolina Cardoso Deuner, Carlos A. Forcelini, Erlei Melo Reis ,
Florindo Castoldi, pelo auxílio fundamental nas análises estatísticas,
na realização da dissertação e nas sugestões
obrigada!

Aos funcionários da UPF!

Em especial á Cinara, Paulo e Mari pela colaboração e paciência,
obrigada!

Aos estagiários e equipe do laboratório!

Que de alguma forma contribuíram para a execução dos experimentos,
obrigada!

SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO	vi
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	01
ABSTRACT	02
1 INTRODUÇÃO	04
2 REVISÃO DE LITERATURA	05
2.1 Ocorrência da mancha foliar “olho-de-rã”.....	05
2.2 Etiologia.....	06
2.3 Sintomatologia.....	07
2.4 Fatores ambientais relacionados à ocorrência da doença.....	08
2.5 Danos.....	09
2.6 Ciclo da doença.....	09
2.6.1 Sobrevivência e fonte de inóculo.....	10
2.6.1.1 Sementes.....	11
2.6.1.2 Restos culturais.....	11
2.6.2 Disseminação.....	11
2.6.3 Infecção.....	12
2.6.4 Colonização.....	12
2.6.5 Reprodução.....	13
2.7 Variabilidade genética de <i>Cercospora sojina</i>	13
2.8 Manejo integrado da mancha foliar “olho-de-rã”.....	13
2.8.1 Controle cultural	14

2.8.2 Controle genético.....	14
2.8.3 Controle químico.....	15
CAPÍTULO I	17
Patogenicidade e virulência de três raças de <i>Cercospora sojina</i> em dois cultivares de soja.....	17
RESUMO	17
ABSTRACT	18
1 INTRODUÇÃO	19
2 MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1 Multiplicação do inóculo.....	21
2.2 Isolamento monospórico.....	22
2.3 Concentração de inóculo de <i>Cercospora sojina</i>	22
2.4 Patogenicidade e virulência de três raças de <i>Cercospora sojina</i> em dois cultivares de soja.....	23
2.5 Reisolamento do fungo <i>Cercospora sojina</i> de folhas de soja com sintomas e caracterização morfológica dos conídios.....	25
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
3.1 Patogenicidade e virulência de três raças de <i>Cercospora sojina</i> em dois cultivares de soja.....	25
3.2 Reisolamento do fungo <i>Cercospora sojina</i> de folhas de soja com sintomas e caracterização morfológica dos conídios.....	30
4 CONCLUSÕES	32
CAPÍTULO II	33
Limiar térmico superior e inferior e temperatura ótima para a germinação de conídios de <i>Cercospora sojina</i> submetidos à luz e escuro.....	33
RESUMO	33
ABSTRACT	34
1 INTRODUÇÃO	35
2 MATERIAL E MÉTODOS	36
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4 CONCLUSÕES	42
CAPÍTULO III	43
Efeito da concentração do inóculo de <i>Cercospora sojina</i> na	

intensidade da mancha foliar “olho-de-rã” em soja.....	43
RESUMO	43
ABSTRACT	44
1 INTRODUÇÃO	44
2 MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1 Cultivo de plantas de soja.....	46
2.2 Produção de inóculo de <i>Cercospora sojina</i>	47
2.3 Isolamento monospórico.....	47
2.4 Preparo da suspensão de inóculo de <i>Cercospora sojina</i>	48
2.5 Inoculação de planta de soja.....	48
2.6 Avaliações da mancha foliar “olho-de-rã” em plantas de soja.....	49
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4 CONCLUSÕES	58
CAPÍTULO IV	59
Crescimento e esporulação de três raças de <i>Cercospora sojina</i> em diferentes regimes luminosos e substratos.....	59
RESUMO	59
ABSTRACT	60
1 INTRODUÇÃO	61
2 MATERIAL E MÉTODOS	62
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4 CONCLUSÕES	70
CAPÍTULO V	71
Interação da temperatura e período de molhamento foliar na intensidade da mancha foliar “olho-de-rã” em soja.....	71
RESUMO	71
ABSTRACT	72
1 INTRODUÇÃO	72
2 MATERIAL E MÉTODOS	74
2.1 Isolamento monospórico.....	75
2.2 Quantificação de inóculo de <i>Cercospora sojina</i>	75
2.3 Cultivo das plantas e inoculação de <i>Cercospora sojina</i> em plantas de soja.....	76
2.4 Período de molhamento foliar das plantas de soja.....	77

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
4 CONCLUSÕES.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
APÊNDICES.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
 CAPÍTULO I		
1	Dados de isolados de <i>C. sojina</i> doados pela Embrapa Soja.....	21
2	Incidência média (%) por folíolo de três isolados de <i>Cercospora sojina</i> em dois cultivares de soja.....	27
3	Severidade média estimada (%) em folíolos de soja de três raças de <i>Cercospora sojina</i> em dois cultivares de soja.....	28
4	Número de lesões por folíolo de três isolados de <i>Cercospora sojina</i> em dois cultivares de soja.....	29
5	Diâmetro de lesões (mm) por folíolo de três isolados de <i>Cercospora sojina</i> em dois cultivares de soja.....	30
6	Comprimento, largura e número de septos de três raças de <i>Cercospora sojina</i> em dois cultivares de soja.....	31
 CAPÍTULO IV		
1	Números de conídios.cm ⁻² de <i>Cercospora sojina</i> , com fotoperíodo de 12 horas luz e escuro.....	67
2	Diâmetro médio das colônias de <i>Cercospora sojina</i> (mm), com fotoperíodo de 12 horas luz e escuro.....	68
 CAPÍTULO V		
1	Efeito de temperaturas e da duração do período de molhamento sobre a incidência (%) das plantas de soja.....	79

2	Efeito de temperaturas e da duração do período de molhamento sobre a Severidade estimada (%) dos folíolos de soja.....	79
3	Efeito de temperaturas e da duração do período de molhamento sobre número de lesões por folíolo.....	80
4	Efeito de temperaturas e da duração do período de molhamento sobre diâmetro de lesões (mm) dos folíolos de soja.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura		
1	Ciclo das relações patógeno-hospedeiro da macha foliar “olho-de-rã” em soja.....	10
CAPÍTULO I		
1	Folíolo de soja com sintomas de <i>Cercospora sojina</i> 15 dias após a inoculação	26
2	Comprimento, largura e número de septos de conídios de <i>Cercospora sojina</i> em magnitude de 10 vezes.....	32
CAPÍTULO II		
1	Conídio não germinado de <i>Cercospora sojina</i>	37
2	Conídio não germinado de <i>Cercospora sojina</i>	37
3	Relação da germinação de conídios de <i>Cercospora sojina</i> em função da temperatura em quatro tempos de exposição com presença de luz.....	38
4	Relação da germinação de conídios de <i>Cercospora sojina</i> em função da temperatura em quatro tempos de exposição sem presença de luz.....	39
CAPÍTULO III		
1	Efeito da concentração de inóculo de <i>Cercospora sojina</i> sobre a Severidade estimada estimada (%) em folíolos de soja com presença de espalhante no cultivar BMX Magna.....	51
2	Efeito da concentração de inóculo de <i>Cercospora sojina</i> sobre a Severidade estimada estimada (%) em folíolos de soja sem presença de espalhante no cultivar	

	BMX Magna.....	52
3	Efeito da concentração de inóculo de <i>Cercospora sojina</i> sobre número de lesões por folíolos de soja com presença de espalhante no cultivar BMX Magna.....	53
4	Efeito da concentração de inóculo de <i>Cercospora sojina</i> sobre número de lesões por folíolos de soja sem presença de espalhante no cultivar BMX Magna.....	54
5	Efeito da concentração de inóculo de <i>Cercospora sojina</i> sobre diâmetro de lesão (mm) em folíolos de soja com presença de espalhante no cultivar BMX Magna.....	55
6	Efeito da concentração de inóculo de <i>Cercospora sojina</i> sobre diâmetro de lesão (mm) em folíolos de soja sem presença de espalhante no cultivar BMX Magna.....	56

CAPÍTULO V

1	Severidade estimada de <i>Cercospora sojina</i> no cultivar de soja BMX Magna.....	81
2	Número de lesões por folíolo de <i>Cercospora sojina</i> no cultivar de soja BM Magna.....	81
3	Diâmetro de lesões por folíolo (mm) de <i>Cercospora sojina</i> no cultivar de soja BMX Magna.....	82
4	Severidade estimada de <i>Cercospora sojina</i> no cultivar de soja BMX Magna.....	83
5	Número de lesões por folíolo de <i>Cercospora sojina</i> no cultivar de soja BMX Magna.....	83
6	Diâmetro de lesões por folíolo (mm) de <i>Cercospora sojina</i> no cultivar de soja BMX Magna.....	84
7	Superfície de resposta da interação entre período de molhamento foliar [horas] e a temperatura [T°C] sobre a severidade (%) de <i>Cercospora sojina</i> no cultivar de soja	

	BMX Magna.....	85
8	Superfície de resposta da interação entre período de molhamento foliar [horas] e a temperatura [T°C] sobre número de lesões por folíolo de <i>Cercospora sojina</i> no cultivar de soja BMX Magna.....	86
9	Superfície de resposta da interação entre período de molhamento foliar [horas] e a temperatura [T°C] sobre diâmetro de lesões por folíolo (mm) de <i>Cercospora sojina</i> no cultivar de soja BMX Magna.....	87

PATOGENICIDADE, ESPORULAÇÃO E INTERAÇÃO ENTRE TEMPERATURA E PERÍODO DE MOLHAMENTO FOLIAR NA INTENSIDADE DA MANCHA FOLIAR “OLHO-DE-RÃ” EM SOJA

JULIANE NICOLODI CAMERA¹

RESUMO – A mancha foliar “olho-de-rã” é uma doença que ocorre frequentemente na Argentina e está iniciando no Brasil nas últimas safras. Os objetivos desse estudo foram: confirmar a patogenicidade e avaliar a virulência de três raças de *C. soja* em dois cultivares de soja BMX Magna e Bragg por meio dos Postulados de Koch, avaliar o tempo necessário para a germinação de conídios de *C. soja* em diferentes temperaturas, com e sem presença de luz, afim de determinar os limiares térmicos inferior e superior, e a temperatura ótima para a germinação dos conídios, quantificar o efeito de diferentes concentrações de inóculo com e sem presença de um espalhante sobre a intensidade da doença em folíolos de soja do cultivar BMX Magna, quantificar a esporulação e diâmetro da colônia de três raças de *C. soja* em cinco substratos, submetidos a dois regimes luminosos, fotoperíodo e escuro e determinar a temperatura e o período de molhamento foliar sobre a intensidade da mancha foliar “olho-de-rã” em soja. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia, em casa-de-vegetação e câmaras

¹ Engenheira Agrônoma, mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

climatizadas da Universidade de Passo Fundo – RS. Comparando os sintomas da doença com as descrições da literatura e com o reisolamento do patógeno, seguido de sua caracterização morfológica, confirmou-se à identificação e patogenicidade de *C. sojina* isolada de folhas de soja. Avaliando a temperatura de germinação constatou-se que a temperatura ótima para a germinação de conídios de *C. sojina* é de 23 °C, sendo que a luz não influenciou na germinação. Avaliando a concentração de inóculo constatou-se que a concentração de 35.000 conídio/mL⁻¹ com presença de um espalhante gera intensidade de doença que possibilita quantificações rápidas e precisas, podendo ser utilizada em futuros trabalhos de pesquisa. Quando avaliou-se a esporulação confirmou-se que as maiores esporulações de *C. sojina* são verificadas para os substratos STT e V8. Quando comparou-se fotoperíodo e escuro verifica-se que o primeiro apresenta maior esporulação de *C. sojina*. Em relação a temperatura e período de molhamento foliar observou-se que a temperatura ótima para a ocorrência de *C. sojina* é de 27 °C, representadas por equações polinomiais quadrática. A intensidade da doença aumenta linearmente à medida que o período de molhamento foliar aumenta, sendo 72 horas ideal para a ocorrência da mancha “olho-de-rã”.

Palavras-chave: *Glycine max*, *Cercospora sojina*, umidade

ABSTRACT – Frogeye leaf spot is a common disease in Argentina and started in Brazil in the last seasons. The objectives of this study were to confirm pathogenicity and to assess the virulence of three

racas of *C. soja* in two soybean cultivars BMX Magna and Bragg through Koch's postulates, determine the time required for germination of *C. soja* conidia at different temperatures, presence of light and the dark, in order to determine the lower and upper thermal thresholds, as well as the optimal temperature for conidia germination, to quantify the effect of different inoculum concentrations with and without a spreader on the disease intensity in soybean leaflets of cultivar BMX Magna, to quantify the sporulation and colony diameter of three races of *C. soja* in five substrates, under two light exposure regimens, photoperiod and darkness and determine the temperature and leaf wetting periods on the intensity of the frogeye leaf spot in soybeans. This work was conducted in the Laboratory of Phytopathology, in greenhouses and climate chambers of the University of Passo Fundo. Comparing the disease symptoms with the overview in the literature and the reisolated pathogen, followed by their morphological characterization, confirmed the identification and pathogenicity of *C. soja* isolated from soybean leaves. Evaluating the temperature of germination it was observed that the optimum temperature for germination of *C. soja* conidia is 23 °C, at the same time as the light has no effect on germination. Assessing the concentration of inoculum was found that the amount of 35.000 conidia.mL⁻¹ with the presence of a spreader generates a disease intensity that allows fast and accurate measurements that can be used in future research. Evaluating the sporulation was possible to confirm that the major sporulation of *C. soja* is checked for STT and V8 substrates. When photoperiod and darkness was compared, photoperiod showed higher sporulation of *C. soja*. In relation to

temperature and leaf wetting periods was observed that to occur *C. sojina* the optimal temperature is 27 °C, represented by quadratic model equations. Disease intensity increases linearly as the leaf wetting period increases, being ideal 72 hours for the occurrence of frogeye leaf spot.

Key-words: *Glycine max*, *C. sojina*, moisture

1. INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merr.] é uma planta herbácea pertencente à família das Fabaceas. Esta planta é originária do sudoeste asiático, e há relatos de seu cultivo a mais de 6 mil anos na China. Atualmente, é uma das mais importantes leguminosas cultivadas em todo o mundo (BORÉM, 1999).

Em diversos países do mundo a soja destaca-se como uma das culturas mais importantes na produção de grãos. No Brasil, a área semeada com a cultura na safra 2010/2011 foi de 24,08 milhões de hectares, um crescimento de 2,6%, em relação a safra 2009/10, quando foram cultivados 23,47 milhões de hectares (CONAB, 2011).

A cultura da soja apresenta grande adaptabilidade em diferentes latitudes, solos e condições climáticas além de ser considerada uma das plantas mais fáceis de serem cultivadas, entretanto, seu potencial produtivo dificilmente é alcançado. Entre os diversos fatores que limitam a obtenção de altas produtividades estão as doenças. Segundo Sinclair & Backman (1989), são listadas mais de 100 doenças afetando a cultura, sendo que 47 foram verificadas no

Brasil, causando perda anual de ordem de 1 bilhão de dólares (YORINORI, 1997). A importância de cada uma das doenças varia com o ano, a região, as cultivares predominantes, época de semeadura e as práticas agronômicas adotadas (SILVA, 2002).

Dentre as doenças de ocorrência na cultura da soja destacar-se a mancha “olho-de-rã”, cujo agente causal é *Cercospora sojina* Hara. Esta doença foi considerada uma das principais doenças foliares, podendo atacar também a haste, as vagens e as sementes (AKEM & DASHIELL, 1994).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ocorrência da mancha “olho-de-rã”

O agente causal da mancha foliar “olho-de-rã” foi descrito pela primeira vez por Hara no Japão em 1915. O relato de sua ocorrência nos Estados Unidos foi feito por Lehman em 1924 (LEHMAN, 1928). Segundo Yorinori & Klingelfuss (2000), a mancha foliar “olho-de-rã” foi a primeira grande epidemia na cultura de soja, sendo responsável pelo início do programa de melhoramento genético visando resistência às doenças no Brasil. Na safra 1970/71, o fungo *C. sojina* foi introduzido através de um lote de sementes da cultivar Bragg, originada dos Estados Unidos onde a mesma foi semeada na Estação Experimental do IPEAME-MA em Ponta Grossa. A partir deste primeiro foco, o fungo disseminou-se por todo o Estado do Paraná, causando severas perdas nos quatro anos seguintes. Do Paraná, a mancha foliar “olho-de-rã” espalhou-se por todo o país, através de

sementes infectadas, causando prejuízos estimados em mais de US\$ 100 milhões. Em 1973, Reis & Kimati (1973) detectaram a doença no Rio Grande do Sul confirmando sua identidade através do Postulado de Koch.

Na Argentina segundo PLOPER et al., (2000), encontrou-se a doença na região de Tucumán, na safra 1997/1998 em algumas plantas isoladas apresentando uma severidade inferior a 1%, nos anos seguintes esta severidade chegou a 10%.

2.2 Etiologia

A mancha “olho-de-rã” tem como agente causal o fungo *C. sojina*, que na fase anamórfica pertence a classe *Deuteromycetes*, ordem *Hyphomycetales*, família *Dematiaceae* e na fase teleomórfica pertence a classe *Dothideomycetes*, ordem *Capnodiales*, família *Mycosphaerellaceae* (ALEXOPOULOS et al., 1996).

O fungo produz conídios e conidióforos que se formam no centro das lesões em dias quentes e úmidos. Os conidióforos apresentam coloração marrom claro a marrom escuro, com 1 a 4 septos retos ou sinuosos, fasciculados com 1-12 geniculados e não ramificados, medindo 52-120 x 4-6 μm . Os conídios apresentam 1-10 septos ou 3-13 septos, caracterizam-se como hialinos, cilíndricos, alongados, fusiformes, raramente acirculares medindo 40-60 x 6-8 μm (MENGISTU et al., 2002) e truncados na base.

Carmona et al., (2009) encontraram conidióforos de *C. sojina* medindo 110 a 203 μm de comprimento e conídios com 1-9 septos, os quais apresentaram medidas entre 26-111 x 5,2-7 μm .

Espécies do gênero *Cercospora* caracterizam-se pelo lento crescimento micelial e pela reduzida esporulação em meios de cultura, sendo que o fungo *C. sojina* apresenta esporulação máxima em meio V8 ágar (VEIGA, 1973), sob fotoperíodo de 12 horas. Estudos envolvendo espécies de *Cercospora* demonstram que temperaturas entre 25 e 27 °C são ideais para produção de conídios (QUEIROZ & MENEZES, 1993). A luminosidade exerce efeito direto sobre a célula fúngica, induzindo ou inibindo a formação de estruturas de reprodução, embora haja algumas espécies que são indiferentes à quantidade e/ou qualidade da luz (HAWKER, 1957).

2.3 Sintomatologia

Os sintomas da mancha foliar “olho-de-rã” caracterizam-se por lesões necróticas que são observadas principalmente em folhas, porém pode ocorrer em todos os órgãos aéreos da cultura da soja como hastes, vagens e sementes. A infecção pode ocorrer em qualquer estágio fenológico da cultura, porém os sintomas são observados geralmente após o florescimento e tornam-se muito evidentes a partir do estágio fenológico R3 - início da formação das vagens (FEHR & CAVINESS, 1977). Segundo Carmona & Scandiani (2009), os tecidos jovens são mais suscetíveis, sendo que na Argentina durante a safra de 2009-2010 com grande frequência encontrou-se lotes de cultivares suscetíveis no estágio vegetativo já apresentando sintomas da doença.

Em plantas inoculadas, as lesões são visíveis entre 8 a 12 dias após a inoculação, produzindo os primeiros conídios após 48 horas (LEHMAN, 1928). As lesões são comumente visíveis em folhas já

expandidas, em decorrência do período latente ser de aproximadamente 14 dias. Se as condições de umidade forem constantes resultaram em maior número de folhas com sintomas. Porém, se ocorrem alternância de períodos secos e úmidos, a doença pode apresentar folhas levemente ou severamente infectadas, respectivamente (PHILLIPS, 1999).

As lesões iniciam como pequenos pontos ou manchas de encharcamento que mudam de coloração para castanho-claro no centro e bordos castanho-avermelhada na parte superior da folha e coloração cinza na parte inferior onde ocorre a esporulação. O diâmetro das lesões varia de 1 a 5 mm, sendo que as menores apresentam coloração mais escura, castanho-avermelhada. Examinando as lesões com o auxílio de lupa, verifica-se a presença de conídios hialinos e conidióforos de coloração negra, na face inferior das folhas. As lesões nas hastes e nas vagens aparecem ao final da granação e apresentam aspecto de anasarca na fase inicial, evoluindo para manchas circulares castanho-escuras nas vagens e manchas elípticas ou alongadas, com bordas castanho-avermelhadas, nas hastes. Na semente, o tegumento apresenta rachaduras e manchas de tamanhos variáveis, de coloração parda a cinza (ALMEIDA et al., 2005).

2.4 Fatores ambientais relacionados à ocorrência da doença.

As condições climáticas ideais para a ocorrência da doença, segundo Phillips (1999) é temperatura entre 25-30 °C e umidade relativa do ar maior que 90%, sendo que nestas condições os conídios

podem germinar na superfície foliar dentro em uma hora na presença de água e temperatura na faixa de 23-30 °C. Em áreas ou locais com rara ocorrência de orvalho ou chuvas, a mancha foliar “olho-de-rã” é esporádica, mas pode tornar-se grave em épocas de chuvas frequentes. Segundo Jones (1968) entre os fatores de ambiente que influenciam as doenças de plantas, a umidade é na maioria das vezes o mais importante, seguido pela temperatura.

A temperatura ótima de germinação e esporulação é de 25 °C (CRUZ & DORRANCE, 2009). Os conídios constituem a fonte de inóculo primário e secundário da doença e são produzidos 48 horas após o aparecimento dos primeiros sintomas visíveis, se a temperatura estiver na faixa de 15-30 °C e a umidade relativa do ar maior que 90%.

Veiga (1973) descreve que o molhamento foliar de 48 horas é suficiente para ocorrer a infecção.

2.5 Danos

Os danos causados por *C. sojina* em soja podem variar de 21 a 60% (MIAN et al., 2008).

2.6 Ciclo da doença

O ciclo de vida de *C. sojina* (Figura 1), é constituído de cinco fases: sobrevivência, disseminação, infecção, colonização e reprodução.

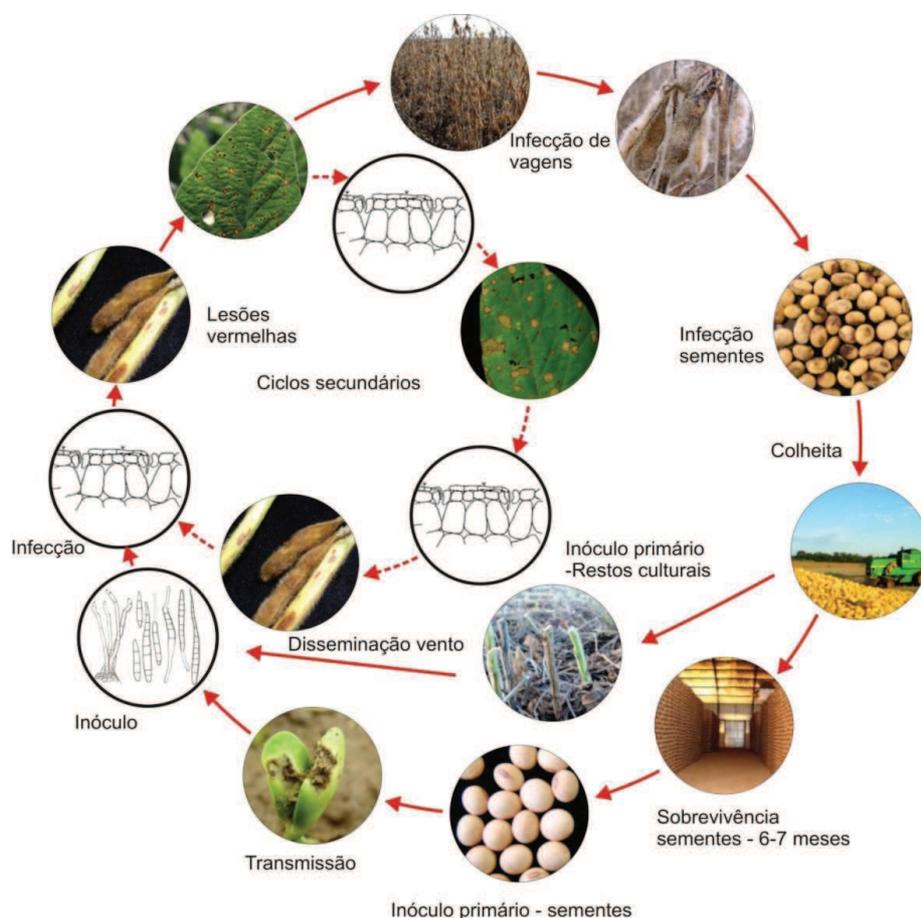


Figura 1 - Ciclo da relação patógeno - hospedeiro da mancha foliar olho-de-rã, em soja (Reis e Danelli, 2010 dados não publicados).

2.6.1 Sobrevivência e fontes de inóculo

O fungo *C. sojae* é necrotrófico, portanto sobrevive principalmente em sementes e restos culturais, sendo que a soja é seu único hospedeiro. Segundo Carmona & Scandiani (2009), na safra 2010, a mancha foliar “olho-de-rã” foi detectada em áreas onde a

cultura antecedente foi soja, sendo assim, é de extrema necessidade a prática de rotação de cultura com plantas não hospedeiras.

2.6.1.1 Sementes

Através das sementes infectadas, o patógeno que apresenta diferentes raças é introduzidas em novas áreas, e assim, é transmitido para os cotilédones e folhas. Scandiani et al. (2009), analisaram amostras de 78 lotes de semente de soja infectados e verificaram que a incidência de *C. sojina* foi de 33%. Carmona et al (2009) detectaram 4,0% de incidência de *C. sojina* em sementes de soja na Argentina.

2.6.1.2 Restos culturais

Uma vez introduzido numa área, os restos culturais constituem a principal fonte de inóculo primário, o patógeno permanece viável como micélio no estado saprofítico entre uma safra e outra. O sistema plantio direto favorece a sobrevivência dos fungos necrotróficos.

2.6.2 Disseminação

Os fungos do gênero *Cercospora* possuem as frutificações (conidióforos e conídios) hidrofóbicas, sendo assim o processo de remoção e transporte pelo vento ocorre quando a superfície dos órgãos ou tecidos esporulantes estiverem secas (MAUDE, 1996). A disseminação ocorre a curtas distâncias por serem esporos pesados (CRUZ & DORRANCE, 2009).

2.6.3 Infecção

O processo de infecção vai desde a germinação dos esporos do patógeno na superfície do hospedeiro até o desenvolvimento das relações estáveis. Para que a infecção ocorra é necessário a presença de água livre sobre a superfície do órgão. Segundo Phillips (1999), os conídios de *C. sojina* quando depositado na superfície foliar, se fixam e emitem o tubo germinativo para iniciar o processo de penetração.

Segundo Yorinori (1989), a germinação e esporulação de *C. sojina* é restringida por temperaturas abaixo de 20 °C. Numerosas infecções secundárias podem ocorrer ao longo do ciclo da cultura se as condições ambientais forem favoráveis, por ser uma doença policíclica.

2.6.4 Colonização

A colonização é a expressão da fase parasítica do agente patogênico, representada pela retirada de nutrientes pelo hospedeiro. Parasitas necrotróficos, por sua vez, matam o hospedeiro antes de invadi-lo, por não precisar manter contato com o hospedeiro vivo. A duração da colonização, ou seja, do processo que tem início no estabelecimento de relação parasitária estáveis e termina com a reprodução do patógeno, é difícil de ser quantificada, em decorrência de não ser possível medir com precisão o momento em que relações parasitárias estáveis são estabelecidas (AMORIM, 1995).

2.6.5 Reprodução

A reprodução do fungo, pode ocorrer na superfície do hospedeiro. Além da umidade relativa e do molhamento foliar, outros parâmetros, como temperatura, luz e estado nutricional do hospedeiro, podem exercer influência na produção de esporos (AMORIM, 1995).

2.7 Variabilidade genética de *Cercospora sojina*

A mancha foliar “olho-de-rã” causa grandes perdas no cultivo da soja, no Brasil. Atualmente, há evidências de 25 raças do patógeno no Brasil e novas raças podem ocorrer (YORINORI & KLINGELFUSS, 2000). Huo et al. (1988) descreveram onze raças deste fungo ocorrente na China, sendo que hoje são encontradas 14. Já nos Estados Unidos foram encontradas 12 raças de *C. sojina* (ATHOW et al., 1952).

A maioria das raças tem uma ampla distribuição, possivelmente devido à grande movimentação de sementes de uma região para outra do país e entre países. Por tanto, é importante o monitoramento contínuo das raças presentes e a continuidade de pesquisas sobre a suscetibilidade dos cultivares comerciais e o desenvolvimento de novas cultivares resistentes (YORINORI, 1989).

Atualmente no Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, exige que o obtentor da semente teste as linhagens de soja com mistura de raças de *C. sojina*.

2.8 Manejo integrado da mancha “olho-de-rã”

Manejo integrado implica na utilização de todas as técnicas disponíveis dentro de um programa unificado, de tal modo a manter a população de organismos nocivos abaixo do limiar de dano econômico e a minimizar os efeitos colaterais deletérios ao meio ambiente (BERGAMIN FILHO & AMORIM, 1996). Entre algumas destas medidas pode-se destacar o controle cultural, controle genético e o controle químico.

2.8.1 Controle cultural

Com a introdução do sistema plantio direto, a rotação de cultura transformou-se em uma prática importante para fortalecer o sistema agrícola (CARMONA, 2003). Esta prática visa erradicar o patógeno da área, onde a cultura só devera voltar na mesma área quando seus restos culturais forem completamente mineralizados.

De acordo com Costamilan et al. (1999), a manutenção de restos culturais na superfície do solo prolonga a viabilidade dos patógenos necrotróficos e sua permanência na área, pois retarda a decomposição dos resíduos, mantendo, por mais tempo, a fonte nutricional. Em Passo Fundo foram necessários 27 meses para que restos de soja fossem totalmente decompostos, além disso é importante a eliminação de plantas voluntárias que funcionam como verdadeiras pontes verdes no intervalo entre uma safra e outra.

2.8.2 Controle genético

A resistência de plantas ao ataque de patógenos pode ser entendida como a capacidade que elas desenvolveram de impedir, restringir ou retardar a penetração destes organismos em seus tecidos, diminuindo os efeitos danosos potenciais (FERNANDES, 2004).

Para Taiz & Zeiger (2004) as diferenças existentes entre cultivares e/ou espécies quanto à resistência à patógenos, frequentemente, dizem respeito à velocidade e à intensidade das reações da planta. Plantas resistentes respondem mais rápida e vigorosamente aos patógenos do que aquelas suscetíveis.

Segundo Carmona & Scandiani (2009), existem inúmeros genes de resistência e raças de patógenos, sendo que a utilização de variedades resistentes é a principal medida de controle. Através desta prática tem-se diminuído e limitado o patógeno em todo o mundo. Existem três genes resistentes dominantes ao patógeno *rsc1* confere resistência à *C. soja* raças 1 a 5, *rsc2* que confere resistência à raça 2 e *rsc3* que confere resistência a todas as raças conhecida no Brasil e nos EUA. Apesar disso a população está sujeita a várias alterações, o que faz o surgimento de novas raças, e a predominância de um gene sobre o outro variam de ano para ano.

2.8.3 Controle químico

A *C. soja* é um fungo necrotrófico, sendo a semente uma importante forma de sobrevivência e disseminação do patógeno, por isso o tratamento de sementes com fungicida é uma importante estratégia de manejo da doença.

A aplicação de fungicida em órgãos aéreos nas cultivares suscetíveis é uma prática que reduz os danos, podendo aumentar o número de grãos e qualidade das sementes colhidas. Os produtos devem ser aplicados observando-se as condições ambientais de umidade relativa mínima de 55%, temperatura máxima de 30 °C e velocidade do vento entre 3 e 10 km/h. A mancha foliar “olho-de-rã” é considerada uma doença de final de ciclo, portanto a aplicação dos fungicidas poderá ser feita a partir do estágio R1 - Início do florescimento (FEHR & CAVINESS, 1977) até o estágio R5.3 - Início do enchimento das sementes (FEHR & CAVINESS, 1977) (INDICAÇÕES, 2011).

Recomenda-se aplicações de fungicidas do grupo químico das estrobilurinas, sendo que os triazóis também são eficazes para o controle de *C. sojina* (CARMONA & SCANDIANI, 2009).

CAPÍTULO I

PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA DE TRÊS RAÇAS DE *Cercospora sojina* EM DOIS CULTIVARES DE SOJA

JULIANE NICOLODI CAMERA¹

RESUMO – Este trabalho teve o objetivo de confirmar a patogenicidade de três raças de *Cercospora sojina* em dois cultivares de soja. Preparou-se uma suspensão na concentração de 40×10^3 conídio.mL⁻¹ para inoculação das plantas com três folhas totalmente expandidas, que foram mantidas em câmara úmida por 48 horas a 25 °C e fotoperíodo 12 horas. Quinze dias após a inoculação avaliou-se a incidência, número e diâmetro de lesões por folíolo do último trifólio totalmente expandido. Os sintomas surgiram como pequenos pontos de coloração pardo-avermelhados, que coalesceram com o tempo. Quando inoculadas no cultivar BMX Magna, as raças 24 e 25 mostraram-se mais virulentas apresentando maior severidade, número e diâmetro de lesões, quando comparadas com a raça 23. Para o cultivar Bragg não ocorreu diferença entre as raças. Em seguida, procedeu-se o isolamento de 100 discos das folhas com sintomas, sendo desinfestados e colocados em placa de petri em meio V8 e incubados por 25 dias a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Decorrido

¹ Engenheira Agrônoma, mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

este tempo, procedeu-se a mensuração de 400 conídios. As três raças de *C. sojina* apresentaram conídios forma alongada, fusiforme, multicelulares e hialinos, e as colônias forma circular e coloração escura. O comprimento e a largura dos conídios variaram de 30 - 110 μm x 7 - 10 μm e o número de septos variou de 1 - 11. Através das medições e contagem dos septos confirma-se a patogenicidade de *C. sojina*.

Palavras-chave: Mancha foliar “olho-de-rã”, postulados de Koch, severidade.

ABSTRACT – This work aimed to confirm the pathogenicity of three races of *Cercospora sojina* in two soybean cultivars. Suspension was prepared at a concentration of 40×10^3 sporos.mL⁻¹ for inoculation of plants with three fully expanded leaves, which were kept in a moist chamber for 48 hours at 25 ° C and 12 hours photoperiod. Fifteen days after inoculation, the incidence, number of lesions and diameter of lesions per leaflet of the last fully expanded trifoliolate. The symptoms appeared as small dots of reddish-brown color, which coalesced over time. When inoculated in Magna BMX cultivar, races 25 was more virulent with higher severity, number and diameter of lesions when compared with race 23. For the Bragg no difference between races, it was also observed that the younger leaves the higher susceptibility to disease. Regarding the incidence no difference between races and cultivars. Later proceeded to the isolation of 100 discs of leaves with symptoms were sterilized and placed in a petri dish on V8 medium and incubated for 25 days at 25 °C and 12 hours photoperiod. After

this time plates were prepared with the structures of the pathogen and measured 400 conidia. The three races of *C. sojina* had elongated, fusiform, multicellular and hyaline, and colonies circular shape and dark color. The length and width of conidia ranged from 30 to 110 μm x 7 - 10 μm and the number of septa varied from 1 to 11. Through measurement and counting of septa confirm the pathogenicity of *C. sojina* through the morphological characterization of the fungus, compared with information available in the literature.

Key-words: Frogeye leaf spot, Koch's postulates, severity.

1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill], é uma das principais culturas na agricultura mundial em função de seu valor nutritivo com diversas aplicações na alimentação humana e animal, bem como no papel sócio econômico, impulsionando de forma significativa o agronegócio.

Dentre as doenças que ocorrem na cultura pode-se destacar a mancha “olho-de-rã”, cujo o agente causal é *Cercospora sojina* Hara (AKEM & DASHIELL, 1994). Para ocorrência desta doença as condições climáticas favoráveis, segundo Phillips (1999), são umidade relativa do ar maior que 90% e temperatura entre 25-30 °C. Em áreas ou estações com pouca ocorrência de orvalho ou chuvas, o fungo é esporádico, mas pode tornar-se grave em épocas de chuvas frequentes.

Segundo Carmona & Scandiani (2009), os tecidos jovens são os mais suscetíveis a doença, porém o processo infeccioso pode ocorrer em qualquer estágio fenológico da cultura. Os sintomas da mancha foliar “olho-de-rã” são visíveis geralmente após a floração e evidentes desde o estágio R3 - início da formação das vagens (FEHR & CAVINESS, 1977). Na Argentina durante o ciclo agrícola 2009-2010, encontrou-se lotes de cultivares suscetíveis no estágio vegetativo apresentando sintomas da doença.

Segundo Lehman (1928), as plantas de soja apresentam sintomas 8 a 12 dias depois da inoculação, sendo que os primeiros conídios são observados após 48 horas, se mantidas as condições de alta umidade. Estas lesões são geralmente visíveis em folhas já expandidas, pois o período de latência pode ser estendido por 14 dias. De acordo com Phillips (1999), se as condições favoráveis de umidade se mantiverem constantes, podem resultar em maior número de folhas com sintomas.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi confirmar a patogenicidade e avaliar a virulência de três raças de *C. soja* em dois cultivares de soja BMX Magna e Bragg por meio dos Postulados de Koch.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido em câmara de crescimento no Laboratório de Fitopatologia – Micologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo -

RS durante o mês de março a maio de 2010, sendo o experimento repetido duas vezes.

2.1 Multiplicação do inóculo

Os três isolados de *C. soja* utilizados nesse trabalho foram fornecidos pela Embrapa Soja, e estão preservados na micoteca do Laboratório de Fitopatologia – Micologia da UPF (Tabela 1).

Tabela 1- Dados de isolados de *C. soja* doados pela Embrapa Soja. UPF, Passo Fundo, RS. 2011

PAÍS	UF	MUNICÍPIO	CULTIVAR	DESCRIÇÃO	PESQ ¹
BR	GO	Niquelândia	Doko	CS-23	José Tadashi
BR	PI	Santa Filomena	BR 28 (Seridó)	CS-24	José Tadashi
BR	MA	Balsas	Cariri	CS-25	José Tadashi

¹: PESQ= Pesquisador responsável pelo isolado.

Após o recebimento, os isolados das raças de *C. soja*, foram repicados com auxílio de agulha histológica flambada, transferindo-se porções da colônia do tubo de ensaio, para placas de petri contendo meio de cultura extrato de tomate (HINE & ARAGAKI, 1963) (Anexo 1). Essas placas permaneceram em câmara de crescimento a

25 °C e com fotoperíodo de 12 horas durante 30 dias, até obter-se esporulação abundante. Em seguida os isolados foram preservados na micoteca do laboratório de Fitopatologia/Micologia da Universidade de Passo Fundo.

2.2 Isolamento monospórico

Posterior a esporulação do fungo foi adicionado, em cada placa de petri com colônias puras do fungo, 10 mL de água destilada e esterilizada com a finalidade de obter-se uma suspensão de conídios. Em seguida, com auxílio de um pincel foi feita a remoção dos conídios. Dessa suspensão foi pipetado 1 mL e em seguida colocado em placas de petri contendo ágar-água a 1%. As placas foram incubadas a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas durante 12 horas.

Decorrido este tempo, observou-se a germinação dos conídios procedeu-se o isolamento monospórico. Com o auxílio de uma espátula esterilizada foram cortados pequenos cubos de ágar-água contendo um único conídio germinado, observado o mesmo ao microscópio. Cada cubo foi transferido para uma placa de petri com 10 repetições contendo meio de cultura extrato de tomate (HINE & ARAGAKI, 1963). As placas foram incubadas a 25 °C e com fotoperíodo de 12 horas durante 30 dias até obter-se esporulação abundante.

2.3 Concentração de inóculo de *Cercospora sojina*

Para a quantificação dos conídios, utilizou-se as três raças de *C. soja* proveniente do isolamento monospórico devidamente esporuladas. A concentração para inoculação foi de 40×10^3 conídios.mL⁻¹. Para ajustar essa densidade foi realizada a remoção dos esporos de placas de petri contendo colônias puras de *C. soja*, com auxílio de pincel, utilizando água destilada e esterilizada. A suspensão obtida foi quantificada, para isso utilizou-se um micropipetador, ajustado para 0,01 mL, realizando a contagem de quatro gotas, considerando cada uma como repetição, visando determinar, o número de conídios.mL⁻¹ da suspensão. Adicionou-se a esta suspensão duas gota de espalhante adesivo, Tween 20 (polioxietilenosorbitano) por litro, para melhorar a distribuição para uma quantificação mais precisa.

2.4 Patogenicidade e virulência de três raças de *Cercospora soja* em dois cultivares de soja

Plantas de soja dos cultivares Bragg e BMX Magna foram cultivadas em copos plásticos de 300 mL, utilizando como substrato solo hortado. A densidade de semeadura usada foi de oito sementes por copo. Após a emergência algumas plantas foram eliminadas, permanecendo apenas duas por recipiente. Em seguida foram mantidos em câmara climatizada com temperatura de 25 °C e fotoperíodo 12 horas. Quando as plantas encontravam-se em estágio V4 - terceira folha trifoliada completamente desenvolvida (FEHR & CAVINESS, 1977), fez-se a inoculação das três raças do fungo de *C. soja*. Esta foi feita através da deposição da suspensão do inóculo

com aspersor manual sobre os três trifólios da soja, até o ponto de escorrimento. Outros cinco copos foram atomizados apenas com água e mantidas sob as mesmas condições ambientais, servindo como testemunhas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizados com arranjo fatorial 3x2 (raças x cultivares) com cinco repetições. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida por um período de 48 horas e temperaturas de 25 °C. Ao término desse período, foram retiradas as câmaras úmidas e esperou-se quinze dias até a manifestação dos sintomas, sendo avaliado o último trifólio totalmente expandido com relação as seguintes variáveis:

Incidência: refere-se ao número de folhas doentes em relação ao total de folhas, para isso atribuiu-se notas de 0% a 100% de incidência.

Severidade estimada: refere-se a porcentagem da área foliar doentes em relação a área total da folha e para isso atribuiu-se notas de 0% a 100% de severidade.

Número de lesões: Nos folíolos onde quantificou-se a severidade contou-se o número de lesões.

Diâmetro das lesões: Mediu-se com o auxílio de um paquímetro digital o diâmetro de quatro lesões por folíolo.

2.5 Reisolamento do fungo *Cercospora sojina* de folhas de soja com sintomas e caracterização morfológica dos conídios.

Para completar o teste de patogenicidade reisolou-se o fungo das folhas inoculadas. Foram cortados 100 discos das folhas sintomáticas os quais foram submetidos a desinfestação durante três minutos com solução aquosa de hipoclorito de sódio a 1,0% e posteriormente lavados com água destilada e esterilizada.

Os discos foram distribuídos em 10 placas de petri contendo meio V8 (TUIITE,1969), e estas foram incubadas por 25 dias em câmara de crescimento a temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após este período comparou-se a morfologia dos conídios (forma, tamanho, número de células, cor dos conídios e coloração das colônias em meio de cultura) segundo informações obtidas na literatura. Para isso, preparou-se lâminas com as estruturas do patógeno e com o auxílio de um microscópio óptico (Olympus XC 31 em objetiva de 10 vezes) fez-se a mensuração de 400 conídios de cada raça nos dois cultivares, de soja sendo estas informações comparadas com as descritas na literatura.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Patogenicidade e virulência de três raças de *Cercospora sojina* em dois cultivares de soja

Quinze dias após a inoculação das três raças de *C. sojina* avaliou-se a incidência, a severidade, o número de lesões e o diâmetro das lesões da mancha foliar “olho-de-rã” do último trifólio de soja

para as três raças inoculadas nos dois cultivares Bragg e BMX Magna

As características das lesões apresentaram-se como pontos de coloração arroxeadada, que com o passar do tempo coalesceram (Figura 1). Reis (1974) descreve que no início, as lesões constituem-se por pequenos pontos pardo avermelhados, podendo atingir até 5 mm de diâmetro, que podem ocorrer isoladamente variando de 0,25 a 0,5 mm de diâmetro. Com o passar do tempo, estas lesões alcançaram diâmetro de até 8 mm e a coloração pode esmaecer no centro da mancha.

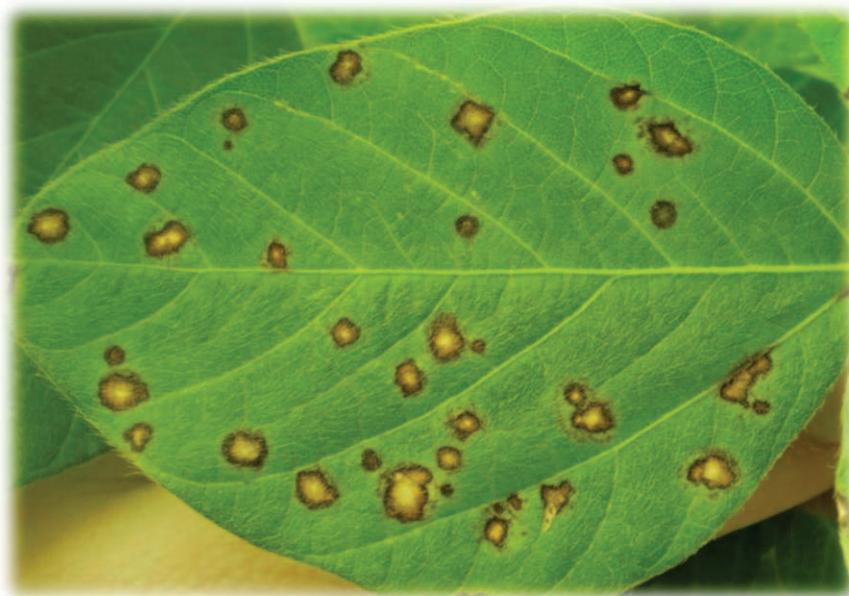


Figura 1- Folhíolo de soja com sintomas de *Cercospora soja* 15 dias após a inoculação. Foto: (Camera. J. N.)

A incidência da mancha foliar “olho-de-rã” variou de 60 a 100% (Tabela 2), porém, não houve diferença estatística independente das raças de *C. sojina* e dos cultivares de soja.

Tabela 2 - Incidência média (%) em folíolos de soja de três raças de *Cercospora sojina* em dois cultivares de soja. Passo Fundo, RS. 2011

RAÇAS	CULTIVARES		Média
	BMX Magna	Bragg	
Raça 23	A 60 a ¹	A 100 a ¹	80
Raça 24	A 100 a	A 100 a	100
Raça 25	A 100 a	A 100 a	100
Média	A 86,6	A 100	
CV (%)	23		

¹ Médias seguidas por mesmas letras, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade do erro.

A severidade nos folíolos avaliados apresentou variação de 0,66 - 12,9% (Tabela 3), sendo que a média total do experimento foi de 4,2%. Para a raça 23 não houve diferença estatística com relação a severidade independente da cultivar testada. Já para as raças 24 e 25, as maiores severidades foram observadas para o cultivar BMX Magna.

Com relação a virulência das raças por cultivar (Tabela 3), observa-se que para o cultivar BMX Magna, as raças 24 e 25 foram mais virulentas, ou seja, apresentaram maior severidade da doença. Para o cultivar Bragg não houve diferença estatística entre as raças testadas.

Tabela 3 - Severidade média estimada (%) em folíolos de soja de três raças de *Cercospora sojina* em dois cultivares de soja. Passo Fundo, RS. 2011

RAÇAS	CULTIVARES		Média
	BMX Magna	Bragg	
Raça 23	A 0,66 b ¹	A 2,4 a ¹	1,5
Raça 24	A 12,9 a	B 2,4 a	7,6
Raça 25	A 11,6 a	B 3,6 a	7,6
Média	A 8,3	A 2,9	
CV (%)	9,67		

¹Médias seguidas por mesmas letras, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade do erro.

O número de lesões por folíolo variou de 1,36 - 37,2 e a média foi de 18,21 lesões por folíolo (Tabela 4). Para a raça 23 não houve diferença estatística com relação a número de lesões por folíolo independente da cultivar testada (Tabela 4). Já para as raças 24 e 25, as maiores severidades foram observadas para o cultivar BMX Magna.

Com relação a virulência das raças por cultivar (Tabela 4), observa-se que para os dois cultivares que a raça 24 e 25 foram mais virulentas, ou seja, apresentaram maior número de lesões por folíolo.

Estes resultados estão de acordo com os descritos por Carmona et al. (2009), no qual os autores descrevem que em experimentos realizados a campo, os folíolos apresentaram lesões que variaram de 20 - 55 lesões por folíolo.

Tabela 4 - Número de lesões por folíolo de soja de três raças de *Cercospora sojina* em dois cultivares de soja. Passo Fundo, RS. 2011

RAÇAS	CULTIVARES		Média
	BMX Magna	BRS Bragg	
Raça 23	A 1,36 b ¹	A 5,71 b ¹	3,5
Raça 24	A 40,1 a	B 10,3 a	25,2
Raça 25	A 37,2 a	B 14,6 a	25,9
Média	A 26,2	B 10,20	
CV (%)	37,09		

¹ Médias seguidas por mesmas letras, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade do erro.

Com relação ao diâmetro das lesões (Tabela 5), os resultados obtidos variaram de 1,51 - 2,95 mm e a média foi de 2 mm. Resultados semelhantes foram obtidos por Kimati (1995), no qual descreve que o patógeno pode apresentar sintomas com lesões variando de 1 a 5 mm. Segundo Gómez (2011), avaliando a patogenicidade de *C. sojina* verificou-se lesões com diâmetro que variou de 0,5 a 10 mm. Para a raça 23 o cultivar que apresentou maior diâmetro de lesão foi o Bragg (Tabela 5), para as raças 24 o maior diâmetro de lesão foi observado no cultivar BMX Magna e para a raça 25, não ocorreu diferença estatística entre os cultivares.

Com relação a virulência das raças por cultivar (Tabela 5), observa-se que para o cultivar BMX Magna, a raça 24 e 25 foram mais virulentas, ou seja apresentaram maior diâmetro de lesão e para o

cultivar Bragg não houve diferença estatística entre as raças testadas. As plantas testemunhas, pulverizadas apenas com água, não apresentaram sintomas da doença.

Tabela 5 - Diâmetro de lesões (mm) por folíolo de soja de três raças de *Cercospora sojina* em dois cultivares de soja. Passo Fundo, RS. 2011

RAÇAS	CULTIVARES		Média
	BMX Magna	BRS Bragg	
Raça 23	B 0,79 b ¹	A 2,12 a ¹	1,4
Raça 24	A 3,14 a	B 1,71 a	2,4
Raça 25	A 2,35 a	A 1,9 a	2,12
Média	A 2,09	A 1,91	
CV (%)	16,3		

¹Médias seguidas por mesmas letras, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade do erro.

3.2 Reisolamento do fungo *Cercospora sojina* de folhas de soja com sintomas e caracterização morfológica dos conídios

As colônias de *C. sojina* foram avaliadas 25 dias após o isolamento, sendo que estas apresentaram colônia circular de coloração escura, semelhantes na descrita na literatura.

Com relação a mensuração dos conídios crescidos em meio V8 (TUIITE, 1969), esses apresentaram forma alongada, fusiforme, multicelulares e hialinos (Figura 2), sendo esses compatíveis com o descrito na literatura.

O comprimento e a largura dos conídios mensurados das três raças dos dois cultivares variaram de 30-110 μm x 7-10 μm , sendo a média total da mensuração foi de 58 x 10 μm , e o número de septos variou de 1-11, sendo que a média foi de 4,6 (Tabela 6). Dados semelhantes foram descritos por Mengistu et al., (2002) onde o mesmo descreve que os conídios apresentam 1-10 septos, são hialinos, cilíndricos, alongados, fusiformes, raramente acirculares, truncados na base medindo 40-60 x 6-8 μm . Já Carmona et al., (2009) encontraram conídios com 1-9 septos, os quais apresentaram medidas entre 26-111 x 5,2-7 μm , colaborando com os dados encontrados neste trabalho.

Tabela 6 - Comprimento, largura (μm) e número de septos de conídios de três raças de *Cercospora sojina* em dois cultivares de soja

Cultivar	Raça	Comprimento		Largura		Septos (n ^o)	
			Média		Média		Média
BMX Magna	23	30 – 60	(42)	10 - 20	(11)	1 – 5	(3)
BMX Magna	24	40 – 110	(59)	9 - 15	(11)	2 - 7	(4)
BMX Magna	25	50 – 110	(74)	8 - 10	(10)	3 - 10	(6)
BRS Bragg	23	30 – 60	(42)	10 - 20	(10)	1 - 5	(3)
BRS Bragg	24	50 – 110	(67)	7 - 10	(10)	3 - 10	(5)
BRS Bragg	25	50 – 130	(68)	9 - 10	(10)	3 - 11	(5)
MÉDIA			58		10		4,6

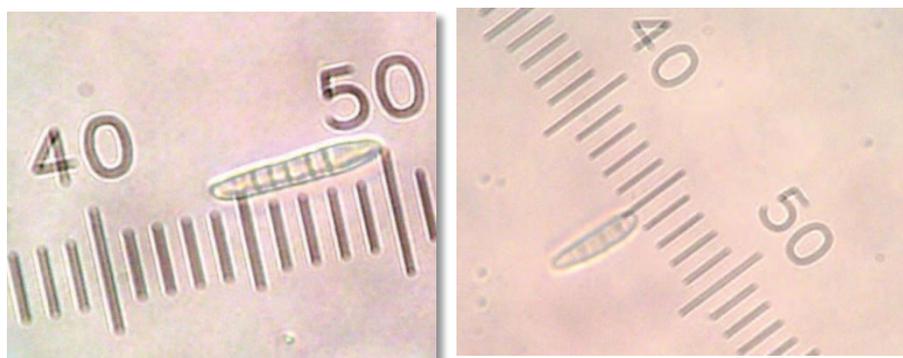


Figura 2 - Comprimento, largura e número de septos de conídio de *Cercospora sojina* em magnitude de 10 vezes. Fotos: (Camera. J. N.)

4 CONCLUSÕES

Confirma-se através dos postulados de Koch que o fungo em estudo é *C. sojina*.

É possível reproduzir os sintomas da mancha foliar “olho-de-rã” e comparar os sinais por meio da caracterização morfológica. As mensurações dos conídios são compatíveis com os descritos na literatura.

As raças 24 e 25 são mais virulentas, apresentando maior severidade, número de lesões, comparadas com a raça 23 quando inoculadas no cultivar BMX Magna.

Não há diferença de virulência entre as raças quando inoculadas no cultivar Bragg.

CAPÍTULO II

LIMIAR TÉRMICO SUPERIOR E INFERIOR E TEMPERATURA ÓTIMA PARA A GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE *Cercospora sojina* SUBMETIDOS À LUZ E AO ESCURO

JULIANE NICOLODI CAMERA¹

RESUMO – A mancha foliar “olho-de-rã” é uma doença de grande importância na Argentina e vem se tornando importante nas principais regiões produtoras de soja do Brasil. O objetivo do trabalho foi determinar o tempo de germinação de conídios de *Cercospora sojina* com e sem a presença de luz, submetido á diferentes temperaturas. Cada tratamento foi constituído de quatro placas, distribuídas ao acaso. Uma suspensão de 600 µL contendo conídios, foi colocada em cada placas de petri contendo meio agar-água, em seguida foram incubadas em DBO com luz e sem luz, em diferentes temperaturas (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 °C), sendo estas retiradas aos tempos de 3, 6, 9 e 12 horas. Decorrido cada tempo, avaliou-se a germinação dos conídios. Para o tempo de 12 horas, a melhor germinação foi na presença de luz e temperatura de 22,4 °C e no escuro de 22,7 °C. Para o tempo de 9 horas foi de 22,9 °C tanto na presença ou ausência de luz. Para o tempo de 6 horas a melhor temperatura foi de 24,3 °C no

¹ Engenheira Agrônoma, mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

fotoperíodo e no escuro foi de 23,4 °C. No tempo de três horas tanto para luz quanto para o escuro a melhor temperatura foi de 23,8 °C. A média de temperatura ótima para a germinação de conídios de *C. sojina* foi de 23 °C. O limiar térmico inferior foi 0 °C e o superior de 40 °C, sendo que a luz não influenciou a germinação dos conídios.

Palavras-chave: Mancha foliar “olho-de-rã”, fotoperíodo, esporos

ABSTRACT – Frogeye leaf spot is a disease of great importance in Argentina and has become important in the main soy-producing regions of Brazil. The objective of this study was to determine the time of germination of conidia of *Cercospora sojina* with and without the presence of light at different temperatures. Each treatment consisted of four cards, distributed at random. A suspension of 600 mL containing conidia was placed in each petri dishes containing agar-water, then were incubated in DBO with light and no light at different temperatures (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 °C), which are taken to the times of 3, 6, 9 and 12 hours. After each time, we evaluated the germination of conidia. For the time of 12 hours, the best germination in the presence of light and temperature of 22,4 °C and 22,7 °C in the dark. For the time of 9 hours was 22,9 °C both in the presence or absence of light. For time of 6 hours at optimum temperature was 24,3 °C in photoperiod and the dark was 23,4 °C. At the time of three hours for both light and dark for the best temperature was 23,8 °C. The average optimum temperature for germination of conidia of *C. sojina* was 23 °C. The lower threshold temperature was

above 0 ° C and 40 ° C, and the light did not influence the germination of conidia.

Key-words: Frogeye leaf spot, photoperiod, spores

1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merr.] originária da região da China Antiga (EMBRAPA, 2008), disseminou-se pelo mundo através dos viajantes ingleses e imigrantes japoneses e chineses. Chegou ao Brasil no início do século XX, mas devido à grande quebra da safra da Rússia e a incapacidade dos Estados Unidos suprirem a demanda mundial em meados dos anos 70, o Brasil superou a China que era o segundo maior produtor do mundo (MISSÃO, 2006).

O potencial de rendimento de grãos desta cultura tem sido limitado em função de muitos fatores. Entre eles, destacam-se, as condições de clima no decorrer do ciclo da cultura, os sistemas de rotação e sucessão de culturas, o manejo e a fertilidade do solo, a escolha de cultivares, a qualidade das sementes, o manejo de plantas daninhas, de insetos-pragas e as doenças (TECNOLOGIAS, 2003).

Entre as diversas doenças que ocorrem na cultura da soja está a mancha foliar “olho-de-rã”, esta que na última safra causou uma epidemia severa na Argentina, manifestando-se com severidade foliar de 30-60% (CARMONA & SCANDIANI, 2009). Segundo Phillips (1999), os conídios do fungo germinam em uma hora na superfície dos folíolos quando a temperatura encontra-se na faixa de 25-30 °C.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o tempo necessário para a germinação de conídios de *C. soja* em diferentes temperaturas, com e sem presença de luz, afim de determinar os limiares térmicos inferior e superior, e a temperatura ótima para a germinação dos conídios.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitopatologia- Micologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, no período de março a junho de 2011. Este experimento foi repetido duas vezes.

Utilizou-se neste trabalho, a raça 25 de *C. soja*, descrita no capítulo 1, por apresentar virulência intermediária entre as raças 23 e 24.

O delineamento inteiramente casualizados com quatro repetições. As temperaturas testadas foram 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 °C por um período de exposição de 3, 6, 9 e 12 horas, com e sem presença de luz. A suspensão de conídios foi obtida através de um pincel e água destilada, raspando as placas de petri contendo o fungo *C. soja* apresentando esporulação abundante. Posteriormente, pipetou-se 600 µL da suspensão preparada anteriormente e foram colocados em 32 placas de Petri de tamanho 60 x 15 mm (esterilizadas) contendo o meio agar-água para cada uma das temperaturas testadas. Estas placas foram mantidas em estufa tipo DBO (Demanda Biológica de Oxigênio) durante 3, 6, 9 e 12 horas,

com e sem presença de luz, sendo que as sem luz foram envolvidas com papel alumínio.

Decorrido o tempo desejado, as placas foram retiradas da BOD e adicionou-se 2 mL de uma solução de acetona sem corante com a finalidade de paralisar o crescimento do fungo. Este procedimento foi realizado para cada tempo, com e sem presença de luz, submetido às diferentes temperaturas.

Determinou-se a germinação através da quantificação de 100 conídios, com auxílio de um microscópio óptico (Olympus CX 31 em magnitude de 40 vezes). Considerou-se germinado, o conídio que apresentou o tubo germinativo mais longo do que sua maior largura ZADOCKS & SCHEIN (1979) (Figura 1a e Figura 1b).

A temperatura ótima foi calculada através da média dos resultados obtidos pela fórmula da regressão de cada um dos tempos. O limiar térmico inferior e superior foram as temperaturas, nas quais não observou-se a germinação dos conídios de *C. sojina*.

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

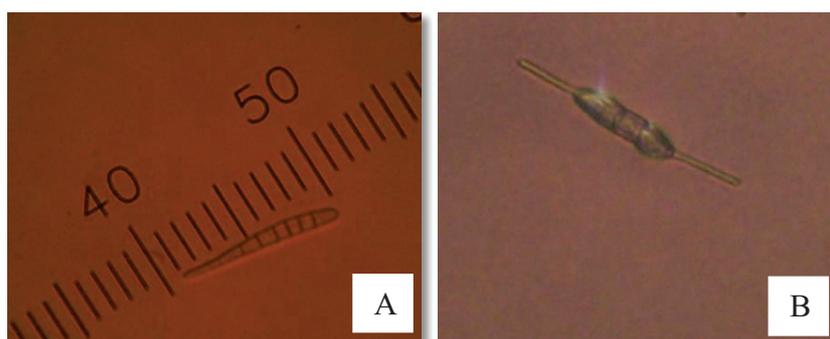


Figura 1a - Conídio não germinado de *Cercospora sojina*. Passo Fundo, RS. 2011

Figura 1b – Conídio germinado de *Cercospora sojina*. Passo Fundo, RS. 2011

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a germinação dos conídios de *C. soja* quando submetidos a presença de luz, no tempo de exposição de 12 horas (Figura 3), verificou-se que a melhor temperatura onde obteve-se a maior percentagem de germinação foi a de 22,4 °C. Para o tempo de 9 horas foi de 22,9 °C, para o tempo de 6 horas de 24,3 °C e para o tempo de 3 horas foi de 23,8 °C. A média da temperatura para a germinação dos conídios, dos quatro tempos de exposição foi de 23,3 °C. A temperatura ótimas para a germinação dos conídios foram calculadas através da fórmula de regressão: $y = -0,1006x^2 + 4,8018x - 29,098$, substituiu-se todos os intervalos de temperatura e onde obteve-se o maior valor de y na temperatura de 22,4 °C.

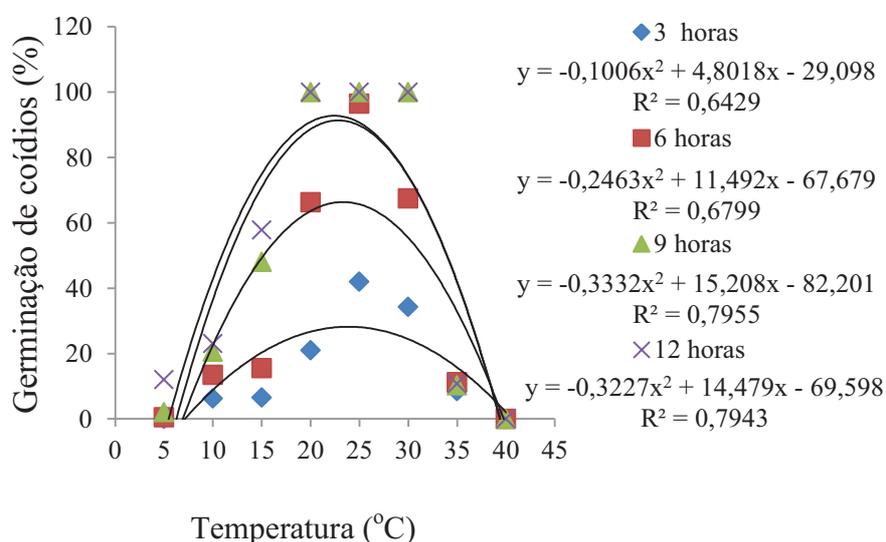


Figura 3 - Relação entre a germinação de conídios de *Cercospora soja* em função da temperatura, em quatro tempos de exposição com presença de luz. Passo Fundo, RS. 2011.

Quando as placas com conídios de *C. soja* foram submetidos ao escuro, no tempo de exposição de 12 horas (Figura 4), a maior percentagem de germinação dos conídios foi obtida na temperatura de 22,7 °C. Para o tempo de 9 horas foi de 22,9 °C, para o tempo de 6 horas foi de 23,4 °C, e para o tempo de 3 horas foi de 23,8 °C. A média da temperatura para a germinação dos conídios nos quatro tempos de exposição foi de 23,2 °C.

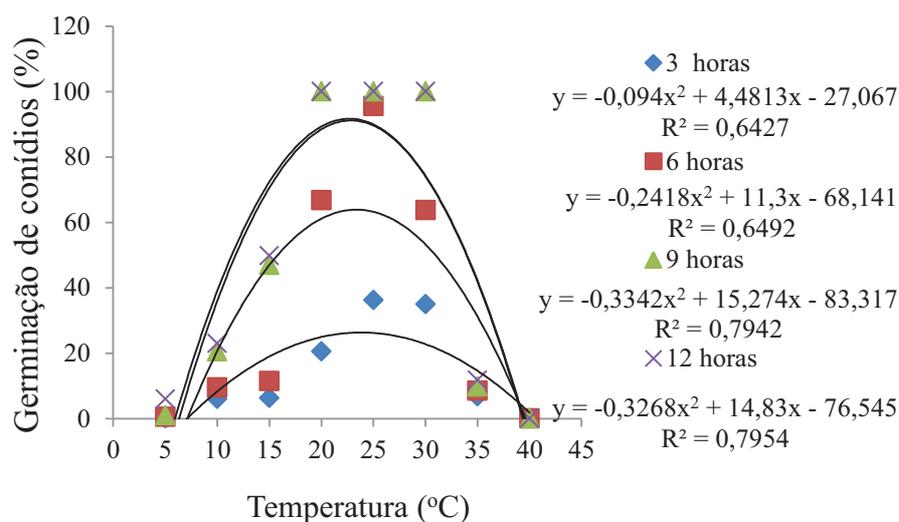


Figura 4 - Relação entre a germinação de conídios de *Cercospora soja* em função da temperatura, em quatro tempos de exposição no escuro. Passo Fundo, RS. 2011.

Observou-se com este experimento, que os conídios de *C. soja* quando submetidos as temperaturas de 0 °C e 40 °C não apresentaram germinação tanto na presença como na ausência de luz,

sendo assim determinou-se que, o limiar térmico inferior foi de 0 °C e o limiar térmico superior foi de 40 °C. Segundo Alfenas & Mafia (2007), é importante determinar as exigências térmicas do microorganismo quando de seu cultivo *in vitro*, com o objetivo de definir o menor tempo necessário para a produção do inóculo requerido em trabalhos de pesquisa.

De acordo com Cruz (2008), a temperatura de 25 °C favorece o crescimento micelial para alguns isolados de *C. soja* amostrados nos EUA, sendo que para isolados adaptados para a região norte as temperatura ótimas podem diferir.

A faixa de temperatura para a ocorrência da mancha foliar “olho-de-rã” é entre 25-30 °C de acordo com Mian et al., (2008). Conforme Phillips (1999), os conídios de *C. soja* germinam com temperaturas compreendidas na faixa entre 25-30 °C, e no tempo de uma hora, quando na superfície dos folíolos de soja. Segundo Cruz (2008), obteve-se um bom crescimento micelial de *C. soja* nas temperaturas entre 17 e 21 °C, sendo a temperatura ótima de 25 °C. O limite para sobrevivência do conídio de *C. soja* é de 32 °C e de – 4,2 °C. Segundo Yorinori (1989), a germinação e esporulação de *C. soja* em soja é restringida por temperaturas abaixo de 20 °C . Os dados obtidos neste trabalho concordam com os encontrados por Gómez (2011), sendo que a mesma relata que a temperatura ótima para a germinação de conídios de *C. soja* é de 25 °C.

Em experimentos realizados com *C. kikuchii* (Matsu. & Tomoyasu) Gardner com captura de esporos, observou-se que a umidade relativa acima de 80% e temperatura entre 20 e 24 °C foram favoráveis para captura de conídios e intensidade da doença. Há certa

relação entre a intensidade de doença e o número de conídios no ar, indicando que a concentração de conídios no ar pode auxiliar no monitoramento da doença (KUDO et al, 2011).

Em trabalhos realizados por Carlini (2009) com *Phakopsora pachyrhizi* Sydow, cujo patossistema ocorre juntamente na cultura com *C. soja*, os resultados obtidos foram semelhantes, aos encontrados neste trabalho, pois o limiar térmico inferior, ou temperatura basal foi de 6,0 °C, na qual ocorreu menor comprimento do tubo germinativo (μm). Abaixo dessa temperatura não ocorreu a germinação dos uredosporos, sendo que a temperatura ótima, obtida foi de 21 °C, onde o tubo germinativo teve maior comprimento. A temperatura máxima foi 35 °C, sendo que acima dessa não ocorreu a germinação dos uredosporos.

Dados semelhantes aos obtidos neste experimento com *C. soja* foram encontrados para o patossistema *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curtis) Weir em soja, a temperatura ótima para a germinação de conídios de *C. cassiicola* é de 23 °C. Os esporos do patógeno germinam em uma ampla gama de temperatura, sendo que seu limiar térmico inferior foi de 7 °C e o limiar térmico superior de 39 °C (MELLO, 2009).

Através dos resultados obtidos neste trabalho pode-se afirmar que o fungo *C. soja* apresenta uma ampla faixa de temperatura para desenvolver-se, sendo que esse fato pode tornar o seu controle mais difícil.

4 CONCLUSÕES

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

Os esporos de *C. soja* germinam em uma ampla faixa de temperatura, sendo que seu limiar térmico inferior é de 0 °C e o limiar térmico superior é de 40 °C.

A luz não influencia na germinação dos conídios de *C. soja*.

CAPÍTULO III

EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE INÓCULO DE *Cercospora sojina* NA INTENSIDADE DA MANCHA FOLIAR “OLHO-DE-RÃ” EM SOJA

JULIANE NICOLODI CAMERA¹

RESUMO – A mancha “olho-de-rã”, cujo agente causal é o fungo *Cercospora sojina*, causa grandes perdas no cultivo da soja, principalmente na Argentina. Em experimento conduzido em laboratório e câmara climatizada, objetivou-se quantificar o efeito de diferentes concentrações de inóculo de *C. sojina* sobre a intensidade da mancha foliar “olho-de-rã” em folíolos de soja. As concentrações de conídios utilizadas foram de 10×10^3 , 20×10^3 , 30×10^3 , 40×10^3 , 50×10^3 e 60×10^3 conídios.mL⁻¹, com e sem presença de um espalhante. Após a inoculação dos conídios por aspersão sobre os folíolos de soja, as plantas foram mantidas com molhamento foliar de 48 horas. Decorrido este período, as plantas permaneceram em câmara climatizada, em temperatura de 25 °C por 15 dias. Avaliou-se a severidade, número e diâmetro de lesões. A concentração de 35.000 conídio/mL com presença do espalhante gerou intensidade de doença que possibilita a quantificação rápida e precisa da doença, pode ser utilizada em futuros trabalhos de pesquisa.

¹ Engenheira Agrônoma, mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

Palavras-chave: Espalhante, conídios, severidade

ABSTRAC - Frogeye leaf spot whose causative agent is the fungus *Cercospora sojina*, causes great losses in the cultivation of soybeans, primarily in Argentina. In an experiment conducted in the laboratory and acclimatized aimed to determine the quantification of the effect of different concentrations of inoculum of *C. sojina* on the intensity of the stain Frogeye leaf spot in soybean leaflets. The concentrations used were conidia of 10×10^3 , 20×10^3 , 30×10^3 , 40×10^3 , 50×10^3 and 60×10^3 conídios.mL⁻¹, with and without the presence of a spreader. After inoculation of conidia spray on soybean leaflets, plants were maintained with 48 hours of leaf wetness. After this period, the plants remained in a climatic chamber at 25 °C for 15 days. We evaluated the severity, number and diameter of injury. The concentration of 35.000 conídio/mL with the presence of the spreader of disease intensity generated that enables the rapid and accurate quantification of disease and can be used in future research.

Key-words: Spreader, conidia, severity

1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merr.] é uma leguminosa com grão rico em proteínas, cultivado como alimento tanto para humanos quanto para animais. Essa cultura é importante na alimentação graças às suas características nutricionais (DOMAGALSKI et al., 1992).

As plantas da família Fabaceae, comumente denominadas leguminosas, são importantes fontes protéicas, ocupando área equivalente a 11% das terras cultiváveis do mundo (CARVALHO, 2002). A soja é uma das leguminosas mais cultivadas no país, da germinação até a colheita, a cultura é submetida a contínuos e variados estresses de natureza biótica e abiótica de diferentes intensidades (BONATO, 2000). Destacam-se os fatores de natureza biótica como, nematoides, vírus, bactérias e por fim, os fungos (HENNING & GODOY, 2006). Dentre os fungos que atacam a cultura da soja está *Cercospora sojina* Hara agente causal da mancha “olho-de-rã”.

Em fitopatologia pratica-se rotineiramente inúmeros trabalhos com inoculação artificial de fungos, visando reproduzir os sintomas da doença. Nestes trabalhos com inoculação artificial, é necessária a determinação da melhor concentração de inóculo e, que leve a resultados reproduzíveis (FERNANDES et al., 1991). Muitos trabalhos já foram desenvolvidos com a finalidade de determinar a melhor concentração de inóculo e demonstraram resultados significativos com outros patossistemas (CARVALHO et al., 1981; FERNANDES et al., 1991; DALLA PRIA et al., 2003; TELES NETO, 2004).

Diferentes intensidades da doença podem ser geradas com diferentes temperaturas, distintas concentrações de inóculo, diferentes durações de período de molhamento foliar, variação da agressividade ou virulência do fungo e reação de cultivares (ZADOKS & SCHEIN, 1979).

Sendo poucas as informações em relação às concentrações de inóculo de *C. soja* capaz de causar infecção na cultura da soja, esse trabalho teve como objetivo quantificar o efeito de diferentes concentrações de inóculo com e sem presença de um espalhante sobre a intensidade da doença em folíolos de soja do cultivar BMX Magna.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia-Micologia, e em câmara climatizada, na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo – RS, durante o período de agosto a novembro de 2010. O presente trabalho foi composto de sete tratamentos, utilizando-se as seguintes concentrações de inóculo (0 , 10×10^3 , 20×10^3 , 30×10^3 , 40×10^3 , 50×10^3 e 60×10^3 conídios.mL⁻¹) com e sem presença de um espalhante [duas gotas por litro de Tween 20 (polioxietilenosorbitano)]. As inoculações foram realizadas quando as plantas encontravam-se em estágio V4 - terceira folha trifoliada completamente desenvolvida (FEHR & CAVINESS, 1977). Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco repetições, com as unidades experimentais constituídas de um copo de plástico com duas plantas, sendo que este experimento foi repetido duas vezes.

2.1 Cultivo de plantas de soja

As plantas de soja, do cultivar suscetível BMX Magna foram cultivadas em copos plásticos de 300 mL, utilizando-se como

substrato 2,0 kg de solo hortado. A densidade de semeadura usada foi de oito sementes por vaso que após a emergência das plântulas foram desbastadas deixando apenas duas plantas por copo. Estas foram mantidas em câmara climatizada com temperatura de 25 °C e com fotoperíodo controlado de 25 °C e 12 horas.

2.2 Produção do inóculo de *Cercospora sojina*

O inóculo utilizado nesse trabalho foi fornecido pela Embrapa Soja, sendo os mesmos preservados na micoteca do Laboratório de Fitopatologia – Micologia da Universidade de Passo Fundo. Utilizou-se neste trabalho a raça 25, sendo que a mesma foi descrita no capítulo 1, por apresentar virulência intermediária entre as raças 23 e 24.

Com auxílio de agulha histológica flambada foram transferidos fragmentos de colônias de *C. sojina* preservados em tubos de ensaio, para placas de Petri contendo meio de cultura extrato de tomate (HINE & ARAGAKI, 1963). Essas placas permaneceram em câmara de crescimento, a 25 °C e com fotoperíodo de 12 horas durante 30 dias, até obter-se esporulação abundante.

2.3 Isolamento monospórico

Posterior a esporulação do fungo foi adicionado em cada placa de petri com colônias puras do fungo, 10 mL de água destilada e esterilizada com a finalidade de obter-se uma suspensão de conídios. Em seguida, com auxílio de um pincel foi feita a remoção dos mesmos. Dessa suspensão foi pipetado 1 mL e em seguida colocado

em placas de petri contendo ágar-água a 1%. As placas foram incubadas a 25 °C por 12 horas, com fotoperíodo de 12 horas.

Decorrido este tempo observou-se a germinação dos conídios e procedeu-se o isolamento monospórico. Com o auxílio de uma espátula esterilizada foram cortados pequenos cubos de ágar-água contendo um único conídio germinado, observado o mesmo ao microscópio. Cada cubo foi transferido para uma placa de petri com 10 repetições contendo meio de cultura extrato de tomate (HINE & ARAGAKI, 1963). As placas foram incubadas a 25 °C e com fotoperíodo de 12 horas durante 30 dias até obter-se esporulação abundante.

2.4 Preparo da suspensão de inóculo de *Cercospora sojina*

A partir das culturas puras obtidas pelo isolamento monospórico, preparou-se uma suspensão de conídios com água esterilizada e outra suspensão com água esterilizada e polioxietilenosorbitano (Tween 20) duas gotas por litro. A densidade de inóculo foi determinada contando-se o número de conídios em 0,01 mL em lâmina de vidro e examinada ao microscópio. A partir da maior concentração 60×10^3 conídios.mL⁻¹, por diluições, obteve-se as concentrações de 50×10^3 , 40×10^3 , 30×10^3 , 20×10^3 e 10×10^3 conídios.mL⁻¹, sendo a testemunha pulverizada apenas com água.

2.5 Inoculação das plantas de soja

As plantas de soja do cultivar BMX Magna foram inoculadas no estádio V4 - terceira folha trifoliada completamente desenvolvida (FEHR & CAVINESS, 1977), com as diferentes concentrações de inóculo utilizando um aspersor manual, até ponto de escorrimento.

Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida com a utilização de caixas de acrílico, cobrindo-as por um período de 48 horas visando manter o molhamento foliar. As plantas permaneceram em câmara climatizada com temperatura constante de 25 °C por 15 dias até o aparecimento dos sintomas da doença.

2.6 Avaliações da mancha foliar “olho-de-rã” em plantas de soja

As avaliações das plantas de soja foram realizadas quinze dias após a inoculação. Foi verificado a intensidade da mancha foliar “olho-de-rã” nos três folíolos de soja do último trifólio totalmente expandido. Para isso, foi atribuído notas de incidência e severidade em folíolos, contou-se o número de lesão por folíolo e diâmetro das lesões (mm) em função das diferentes concentrações de inóculo de *C. soja*.

Incidência: refere-se ao número de folhas doentes em relação ao total de folhas, para isso atribuiu-se notas de 0% a 100% de incidência.

Severidade estimada: refere-se a porcentagem de folhas doentes em relação a área total da folha e para isso atribuiu-se notas de 0% a 100% de severidade.

Número de lesões: Nos folíolos onde quantificou-se a severidade contou-se o número lesões.

Diâmetro das lesões: Mediu-se com o auxílio de um paquímetro digital o diâmetro de quatro lesões do folíolo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na intensidade de *C. sojina*, seja com ou sem espalhante, mostra que há relações entre a densidade de inóculo e a intensidade de doença (severidade, número de lesões por folíolo e diâmetro de lesões), sendo essas representadas por equações polinomiais quadrática (Figura 1 a 6). Os dados demonstram um aumento crescente da intensidade da *C. sojina* com o aumento da concentração de inóculo atingindo o nível mais alto (ponto máximo) no gráfico das variáveis avaliadas para, posteriormente, diminuir com o aumento da concentração.

No experimento onde testou-se as diferentes concentrações de inóculo de *C. sojina* com presença do espalhante (Figura 1), a maior severidade da mancha foliar “olho-de-rã” foi obtida na concentração de 34.000 conídios.mL⁻¹, sendo que esta foi calculada através da fórmula de regressão: $y = -4E - 08x^2 + 0,0027x - 26,16$, substituiu-se todos os intervalos de concentrações e onde obteve-se o maior valor de y na concentração de 34.000 conídios.mL⁻¹.

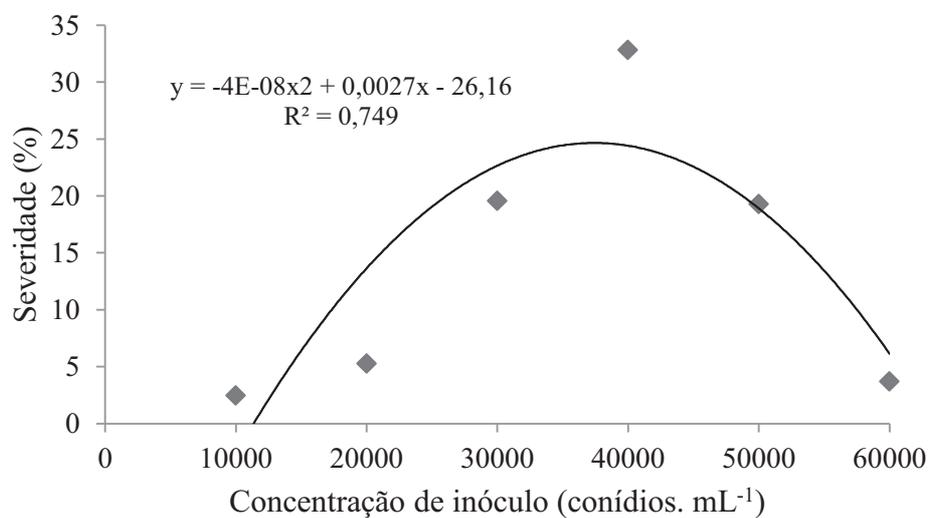


Figura 1 - Efeito da concentração de inóculo de *Cercospora sojina* sobre a severidade estimada (%) em folíolos de soja com presença de espalhante no cultivar BMX Magna. Passo Fundo, RS. 2011.

Neste mesmo experimento, onde testou-se as diferentes concentrações de inóculo de *C. sojina* sem presença do espalhante (Figura 2), a maior severidade da mancha foliar “olho-de-rã” foi obtida na concentração de 50.000 conídios.mL⁻¹. Quando compara-se com e sem presença do espalhante verificou-se que a maior severidade da doença foi com a utilização do espalhante.

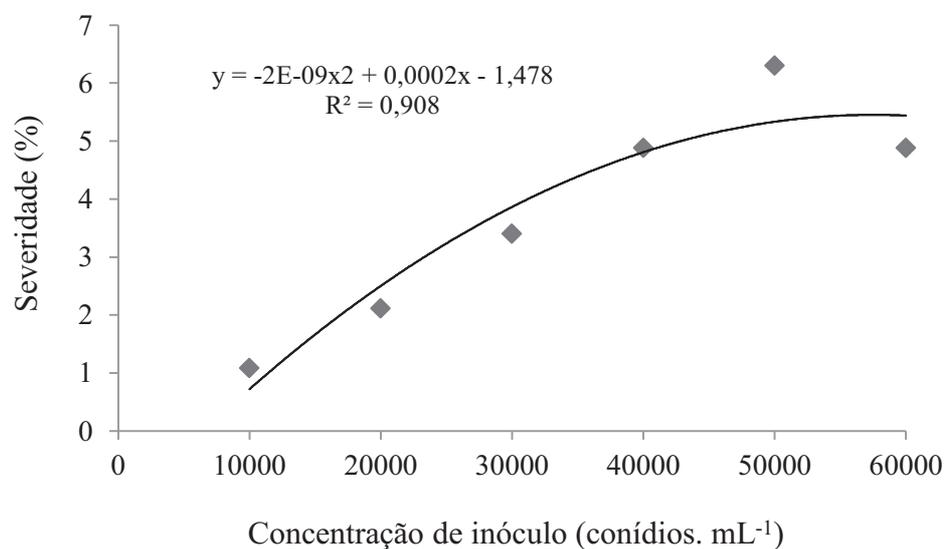


Figura 2 - Efeito da concentração de inóculo de *Cercospora sojina* sobre a severidade estimada (%) em folíolos de soja sem presença de espalhante no cultivar BMX Magna. Passo Fundo, RS. 2011.

Em relação ao número de lesões por folíolo (Figura 3), o maior valor foi obtido na concentração de 36.000 conídios.mL⁻¹, com a adição do espalhante, segundo a equação da regressão.

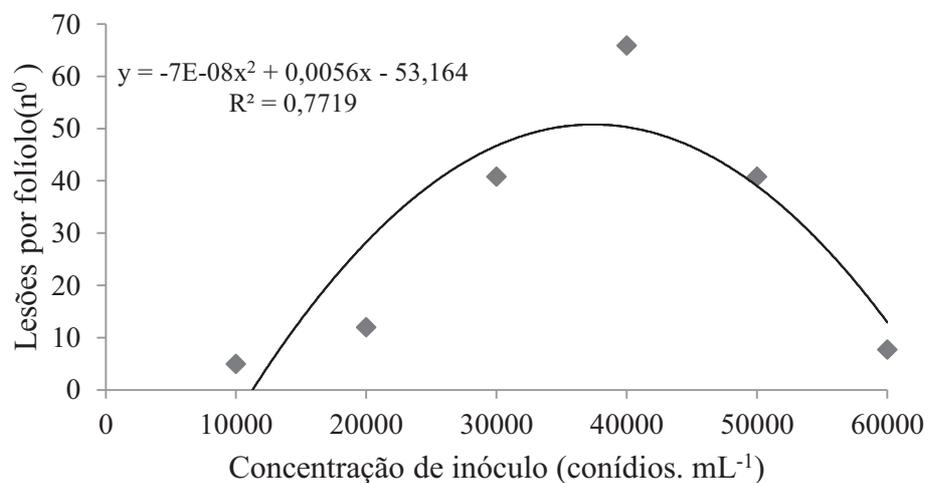


Figura 3 - Efeito da concentração de inóculo de *Cercospora sojina* sobre número de lesões por folíolo com presença de espalhante no cultivar BMX Magna. Passo Fundo, RS. 2011.

Sem a presença do espalhante (Figura 4), o maior número de lesões foi obtido na concentração de 57.000 conídio.mL⁻¹ de acordo com a equação da regressão.

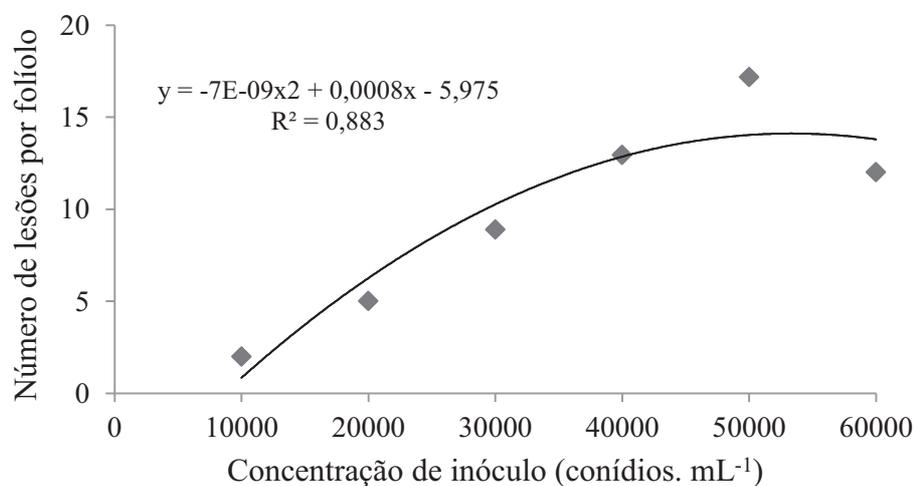


Figura 4 - Efeito da concentração de inóculo de *Cercospora sojina* sobre lesões por folíolo (n^0) sem presença de espalhante no cultivar BMX Magna. Passo Fundo, RS. 2011.

Nos folíolos de soja, onde avaliou-se o diâmetro de lesões com presença do espalhante (Figura 5), a concentração de 36.000 conídios. mL⁻¹ apresentou o maior diâmetro pela equação da regressão.

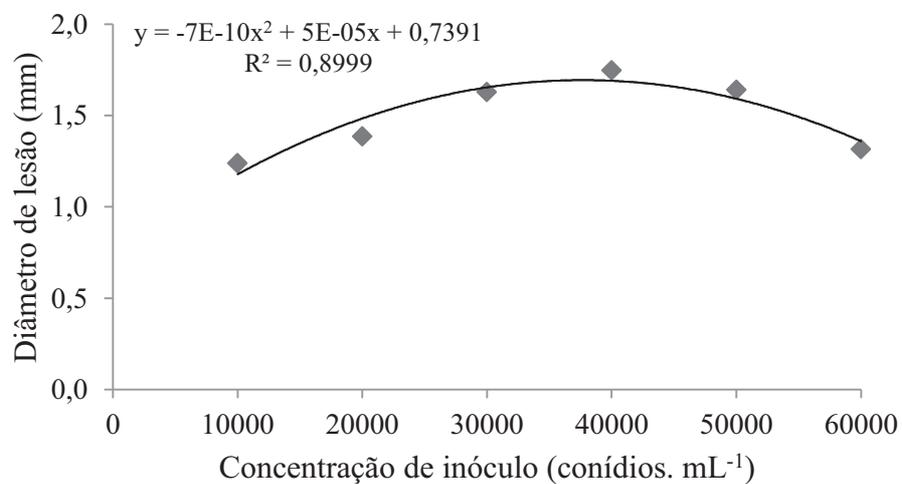


Figura 5 - Efeito da concentração de inóculo de *Cercospora sojina* sobre diâmetro de lesão (mm) em folíolos de soja com presença de espalhante no cultivar BMX Magna. Passo Fundo, RS. 2011.

Porém onde avaliou-se o diâmetro de lesões sem espalhante (Figura 6), a melhor concentração foi de 38.000 conídios.mL⁻¹ demonstrada pela equação de regressão.

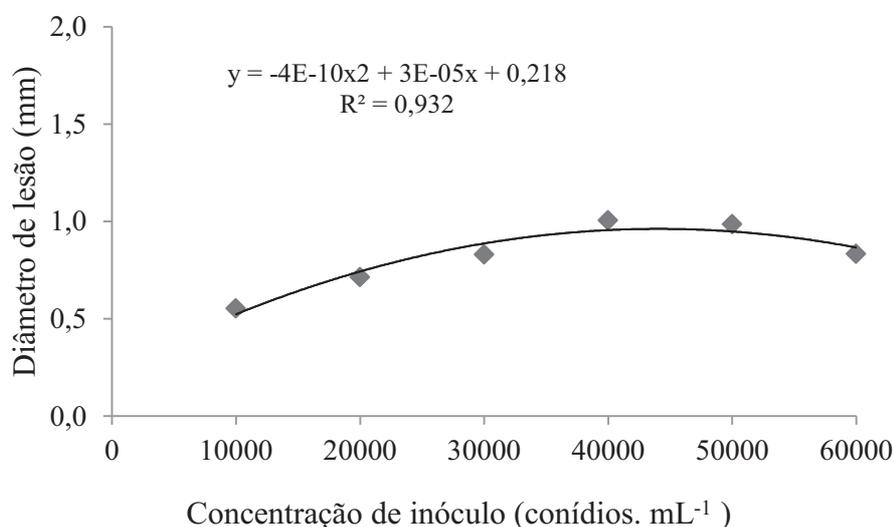


Figura 6 - Efeito da concentração de inóculo de *Cercospora soja* sobre diâmetro de lesão (mm) em folíolos de soja sem presença de espalhante no cultivar BMX Magna. Passo Fundo, RS. 2011.

Dados semelhantes aos descritos neste trabalho, foram obtidos por Barba (2000), em experimento realizado com *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.), onde o mesmo testou diferentes concentrações de inóculo. Os dados deste autor demonstram um aumento crescente da intensidade da mancha marrom com o aumento da concentração de inóculo de *B. sorokiniana* que após atingir o nível mais alto (ponto máximo) do número de manchas por folha e de severidade da doença, ocorreu a diminuição das mesmas. Esse aumento pode ser atribuído ao fato de que altas densidades de inóculo podem produzir um efeito antagônico na germinação dos esporos e/ou vários esporos podem participar de uma única infecção. As variáveis avaliadas da doença, podem aumentar proporcionalmente com a concentração de esporos

do patógeno até uma determinada concentração, acima da qual, dependendo do patossistema, pode ocorrer uma redução, causada, provavelmente, pela auto-inibição da germinação dos esporos, assim como pela existência de um número limitado de sítios de infecção (BARBA, 2000). Não se encontrou informações específicas sobre este fenômeno a respeito do patossistema soja x *C. sojina*.

A média das concentrações obtidas nas variáveis avaliadas (severidade, número de lesões e diâmetro de lesões) foi de 35.000 conídio/mL na presença do espalhante, e na ausência a média foi de 48.000 conídios. mL⁻¹.

A melhor concentração de inóculo de *C. sojina* encontrada neste trabalho está de acordo com Carmona et al., (2009), onde o mesmo utilizou a concentração de 30.000 conídio.mL⁻¹ para a inoculação em seus experimentos com este fungo. Esta mesma concentração foi utilizada por Veiga (1973) em seus trabalhos com reação de cultivares onde o mesmo utilizou as cultivares Bragg, Davis e Halle-7. Porém discordam com os descritos por Gómez (2011), onde a mesma conclui em seu trabalho que a melhor concentração para inoculação de *C. sojina* é de 10.000 conídio.mL⁻¹.

Em relação a utilização do espalhante os resultados demonstraram que foi possível inocular menor quantidade de conídios.mL e obter maior intensidade da doença . Segundo Vidal & Flek (2006), a absorção de alguns produtos pela folha é dificultada devido a presença de uma barreira natural. Uma das principais barreiras encontrada é a cutícula, esta tem a função de revestir externamente as folhas dos vegetais e de proteger o tecido foliar da desidratação. Por ser constituída por substâncias lipofílicas e pela

existência de placas de cera, possuem a capacidade de repelir a água, reduzindo ou dificultando o molhamento foliar e conseqüentemente, interferindo na penetração do fungo.

Na maioria das vezes, a utilização de substâncias tenso-ativas ou espalhantes podem reduzir a tensão superficial das gotas pulverizadas causando o seu achatamento aumentando assim, a superfície de contato e prolongando a vida da gota (THEISEN & RUEDELL, 2004). Segundo SUTTON (1988) o prolongamento do período de molhamento, pode aumentar a eficiência da infecção de alguns fungos que requerem maior tempo de molhamento no processo infeccioso.

4 CONCLUSÕES

Quanto ao efeito da densidade de inóculo na intensidade de *C. sojina*, o modelo de regressão seguiu uma tendência polinomial quadrática.

A concentração de 35.000 conídio.mL⁻¹ com presença de um espalhante gera intensidade de doença que possibilita quantificações rápidas e precisas, podendo ser utilizada em futuros trabalhos de pesquisa.

A presença do espalhante permite reduzir o número de conídios.mL⁻¹ de *C. sojina*, resultando em maior intensidade da mancha foliar “olho-de-rã”.

CAPÍTULO IV

CRESCIMENTO MICELIAL E ESPORULAÇÃO DE TRÊS RAÇAS DE *Cercospora sojina* EM DIFERENTES REGIMES LUMINOSOS E SUBSTRATOS

JULIANE NICOLODI CAMERA¹

RESUMO – O substrato e o regime luminoso são fatores que podem influenciar o crescimento micelial e a esporulação de muitas espécies de fungos. Este experimento foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes substratos e regimes luminosos na esporulação de *C. sojina*. Foram utilizadas placas de petri com cinco meios de cultura diferentes - solução batata dextrose ágar (BDA), suco de tomate temperado (STT), alimento infantil (AI), suco V8 ágar (V8) e farinha de aveia ágar (FAA). As três raças de *C. sojina* foram crescidas nos cinco substratos e submetidas ao fotoperíodo e ao escuro. O delineamento experimental utilizado foi fatorial triplo (substrato, regime luminoso, raças de *C. sojina*) com quatro repetições. Observou-se que as maiores esporulações de *C. sojina* foram para as raças 23 no substrato STT e para as raças 24 e 25 no V8, quando submetidas ao fotoperíodo, e para as raças 23 e 24 no substrato STT e V8 e para a raça 25 no V8 e FAA no escuro. Quando comparou-se

¹ Engenheira Agrônoma, mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

fotoperíodo e escuro verificou-se que o primeiro apresentou maior esporulação do fungo. O substrato AI apresenta o maior diâmetro das colônias, independente da raça de *C. soja* e regime luminoso, porém, não houve relação entre maior diâmetro de colônia com maior esporulação de *C. soja*.

Palavras-chave: Meio de cultura, fotoperíodo, mancha foliar “olho-de-rã”

ABSTRACT - The substrate and light exposure regimens are factors that can influence the growth and sporulation of many species of fungi. This experiment was conducted to evaluate the effect of different substrates and light exposure regimens on sporulation of *C. soja*. Petri dishes were used with five different culture media - solution potato dextrose agar (PDA), tomato juice (TJ), infant food (IF), V8 juice agar (V8) and oatmeal agar (OA). The three races of *C. soja* were grown on five substrates and subjected to the photoperiod and the darkness. Experimental design was triple factorial (substrate, light exposure regime, races of *C. soja*) with four replications. It was observed that the higher *C. soja* sporulation were races 23 on tomato juice, races 24 and 25 for V8 substrate when subjected to the photoperiod, and races 23 and 24 on tomato juice and V8 substrate, race 25 on V8 and OA in the dark. When photoperiod and darkness was compared, the fungus showed higher sporulation at photoperiod. The substrate IF has the major diameter of the colonies, regardless of *C. soja* race and light exposure regime, however, there was no

relationship between greater diameter of the colony with higher sporulation of *C. sojae*.

Key-words: Culture media, photoperiod, frog-eye leaf spot

1 INTRODUÇÃO

A dificuldade em conseguir isolados esporulantes, ou mesmo padronizar condições ideais para a esporulação de fungos fitopatogênicos é um dos principais problemas enfrentados por grupos de pesquisa. Tanto a qualidade como a intensidade da luz são fatores que podem afetar a taxa de crescimento vegetativo, indução da formação de estruturas reprodutivas, pigmentação, forma e tamanho de grande parte das espécies fúngicas (TEIXEIRA et al., 2001; MINUSSI et al., 1977).

Segundo Teixeira et al (2001), a irradiação luminosa pode induzir, inibir ou ter efeito neutro sobre o crescimento e a esporulação dos fungos. A luz estimula a reprodução assexuada e sexual na maioria dos fungos, e seu efeito está intimamente relacionado à nutrição e à temperatura. A maioria dos fungos sensíveis à luz esporula quando expostos à luz contínua, mas alguns, chamados de esporuladores diurnos, requerem um período no escuro seguidos por um período no claro. Alguns fungos necessitam de luz para iniciar a formação de conidióforo e a esporogênese, entretanto, a esporulação é inibida pela luz (DHINGRA & SINCLAIR, 1995).

Além disso, um equilíbrio apropriado entre nutrientes no substrato é um fator importante para o crescimento e esporulação de fungos (LILLY & BARNETT, 1951). Muitos utilizam glicose como fonte de carbono (CARLILE & WATKINSON, 1994) e nitrogênio prontamente assimilável é indispensável para o desenvolvimento fúngico (GARRAWAY & EVANS, 1984), dentre outras substâncias fundamentais para o crescimento do mesmo.

Apesar do grande número de espécies de *Cercospora* conhecidas, poucas têm sido cultivadas artificialmente ou estudadas do ponto de vista fisiológica. Existe um consenso de que essas espécies fúngicas apresentam, como características comuns, crescimento lento e escassez de esporulação, ou mesmo a sua ausência em meios de cultivo utilizados rotineiramente em laboratório (BLANEY, 1987).

O objetivo desse trabalho foi quantificar a esporulação e diâmetro da colônia de três raças de *C. sojina* em cinco substratos, submetidos a dois regimes luminosos, fotoperíodo e escuro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fitopatologia - Micologia e em câmara de crescimento da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, no período de outubro a dezembro de 2010. O delineamento experimental usado foi inteiramente casualizados, com arranjo fatorial triplo 5x2x3 (substratos x regime luminoso x raças de *C. sojina*), com quatro repetições. Este experimento foi repetido duas vezes.

As raças de *C. jejuni* deste experimento foram as mesmas utilizadas no trabalho de patogenicidade e virulência, descritos no capítulo 1. Os substratos utilizados neste trabalho foram:

1) Farinha de aveia ágar (FAA) - 40 g de farinha de aveia, 18 g de ágar, 0,2 g estreptomicina, 1 L água (FERNANDEZ, 1993).

2) Suco de tomate temperado (STT) - 200 mL de suco de tomate temperado “Super bom”; 16 g de ágar; 3,2 g de CaCO₃, 0,2 g de estreptomicina e 800 mL de água destilada (modificado TUIITE,1969)

3) Suco V8 ágar (V8) - 200 mL suco V8 (contém suco de tomate, mistura de sucos vegetais como: cenoura, aipo, beterraba, salsa, alface, agrião e espinafre, sal, antioxidante, ácido ascórbico, acidulante ácido cítrico e aromatizante. Produto de Campbell Soup Co.), 3 g d CaCO₃, 15 g de ágar, 0,2 g de estreptomicina, 1 L de água destilada (TUIITE,1969);

4) Alimento infantil (AI) - 10 g de alimento infantil (contém água, cenoura, batata, feijão, cebola, chuchu, óleo de milho, polpa de tomate, leite desnatado, soro de leite, óleo de canola, amido, farinha de arroz, beterraba, sal. Produto de Nestlé Brasil Ltda), 18 g de ágar, 0,2 g de estreptomicina, 1 L de água destilada (ALMEIDA, 1976).

5) Batata dextrose Ágar (BDA) - 200 g de batata, 17 g de dextrose, 15 g de ágar, 0,2 g estreptomicina, 1 L de água destilada (TUIITE, 1969).

Após o preparo, todos os meios de cultura foram autoclavados a 121 °C por 20 minutos e vertidos assepticamente em placas de petri. Inicialmente foram preparadas oito placas de petri (60 x 15 mm) para

cada um dos meios de cultura, sendo que no centro de cada placa de petri, depositou-se um disco de micélio de 4,68 mm de diâmetro do fungo crescido. Em seguida, quatro placas de cada meio de cultura foram submetidas ao escuro, sendo estas envolvidas em papel alumínio e quatro foram submetidas à fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro.

Os tratamentos foram distribuídos ao acaso, em câmara de crescimento, com lâmpadas OSRAM Universal, 40 watts, com temperatura de 25 °C e permaneceram em câmara de crescimento por vinte e cinco dias. Decorrido este tempo procedeu-se as avaliações que foram a quantificação da esporulação e medição do diâmetro da colônia de três raças de *C. soja* em cinco substratos, submetidos a dois regimes luminosos, fotoperíodo e escuro.

Para a quantificação dos conídios de *C. soja*, adicionou-se 5 mL de água destilada na placa de petri e com o auxílio de um pincel removeu-se os conídios. Desta suspensão pegou-se 1 mL que foi diluído em 10 mL de água, em seguida, pipetados 10 µL para a contagem de conídios por mL. Esse procedimento foi realizado quatro vezes, em cada uma das repetições dos tratamentos. Os dados foram transformados em número de esporos por cm² (Transformou-se o número de esporos encontrado no volume conhecido para número de esporos por mL, posteriormente transformou para número de esporos por cm², conhecendo-se a área da colônia) . Para a medição do diâmetro das colônias utilizou-se um paquímetro digital.

O número de conídios por cm² e o diâmetro das colônias foram submetidos à análise da variância e ao teste de comparação de médias por Tukey 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação ao regime luminoso, observou-se que as maiores esporulações de *C. soja* foram para as raças 23 no substrato STT e para as raças 24 e 25 no substrato V8, quando submetidas ao fotoperíodo (Tabela 1). No escuro, as raças 23 e 24 apresentaram as maiores esporulações no substrato STT e V8 e a raça 25 no substrato V8 e FAA. Portanto, as maiores esporulações de *C. soja* foram verificadas para os substratos V8 e STT.

As menores esporulações de *C. soja* foram verificadas no fotoperíodo de 12 horas para as raças 23 e 24 no substrato FAA e para a raça 25 no BDA. No escuro, as raças 23 e 24 apresentaram menor esporulação nos substratos AI, BDA e FAA e para a raça 25 no meio BDA.

Quando comparou-se fotoperíodo e escuro verificou-se que o primeiro apresentou maior esporulação do fungo na média do experimento, sendo estatisticamente superior ao escuro (Tabela 1).

Com relação aos substratos (Tabela 1), para o meio AI e BDA, a maior esporulação foi verificada para a raça 25 no fotoperíodo sendo esta estatisticamente superior as raças 23 e 24. A menor esporulação foi observada para as raças 23, 24 e 25 no escuro. O substrato STT apresentou maior esporulação para a raça 25 no fotoperíodo, seguida estatisticamente pela raça 23. No escuro, verificou-se que todas as raças foram estatisticamente inferiores aos demais tratamentos. Para o substrato V8, verificou-se comportamento semelhante ao STT, porém a melhor esporulação foi observada para a raça 24 e não para a raça

25. Para o substrato FAA, novamente a raça 25 no fotoperíodo foi estatisticamente superior, seguido pela raça 25 no escuro. A menor esporulação foi para as raças 23 e 24 no escuro.

Para os substratos (Tabela 2), independente da raça de *C. sojina* e regime luminoso, o substrato AI apresentou o maior diâmetro das colônias, sendo estatisticamente superior aos demais tratamentos. Porém, não houve relação entre maior diâmetro de colônia com maior esporulação de *C. sojina*.

No escuro, o menor diâmetro das colônias foi verificado no substrato STT (raças 23, 24 e 25) e BDA (raça 24). No fotoperíodo, foi o substrato BDA (raças 23 e 25) e STT (raça 25).

Uma das características do gênero *Cercospora* é o crescimento lento e a escassez de esporulação em meios artificiais (BRUNELLI et al., 2006). Veiga & Kimati (1974) verificaram que os substratos suco V8 ágar (V8) e farinha aveia ágar (FAA) foram os melhores para a esporulação de *C. sojina*, porém neste experimento o meio FAA não apresentou boa esporulação, apesar de ter apresentado o maior diâmetro das colônias do fungo.

Os substratos V8 e extrato de tomate (variação do meio V8), são aqueles que apresentam maior riqueza nutricional e maior quantidade de carboidratos complexos. Estas características são citadas por diversos autores como capazes de induzir a reprodução de muitos fungos mitospóricos (LUKENS, 1963; STRANDBERG, 1987). O meio V8 é relatado como bom indutor de esporulação em várias espécies do gênero *Cercospora* (BECKMAN & PAYNE, 1963; HANADA et al., 2002; QUEIROZ & MENEZES, 1993). O substrato

Tabela 1 – Números de conídios por cm⁻² de *Cercospora soja* com fotoperíodo e escuro. Passo Fundo, RS. 2011

Substrato	Escuro					Fotoperíodo ¹					Média
	Raça 23	Raça 24	Raça 25	Raça 24	Raça 25	Raça 23	Raça 24	Raça 25	Raça 24	Raça 25	
AI	C 81,95 b	C 248,80 b	C 287,69 bc	B 8335,72 b	B 8206,95 b	A 16142,22 c	5550,55				
STT	E 297,75 a	D 1251,92 a	DE 611,72 c	B 16507,91 a	C 5577,75 c	A 21874,66 b	7686,95				
BDA	C 21,65 b	C 0,00 b	C 0,00 d	B 2030,97 d	B 1755,41 d	A 2688,10 e	1082,68				
V8	E 201,58 a	DE 1114,66 a	D 2273,66 a	C 4634,64 c	B 17395,54 a	A 32784,62 a	9734,11				
FAA	D 86,33 b	D 84,82 b	B 2134,76 a	C 801,90 e	C 738,67 e	A 5539,75 d	1564,37				
Média	137,85	540,04	1061,56	6462,22	6734,86	15805,87					
Média	B 579,81						A 6013,88				
CV %	10,89										

Médias seguidas por mesmas letras maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade do erro.

¹ Fotoperíodo = 12 luz/ 12 horas escuro.

Tabela 2 – Área média das colônias de *Cercospora sojina* (cm²), sob fotoperíodo e escuro. Passo Fundo, RS. 2011

Substrato	Escuro					Fotoperíodo ¹			Média
	Raça 23	Raça 24	Raça 25	Raça 23	Raça 24	Raça 25			
AI	A 14,95 a	A 15,60 a	A 16,64 a	A 15,04 a	A 14,82 a	A 15,02 a			15,34
STT	A 11,30 c	A 10,37 c	A 10,66 d	A 12,24 b	A 11,22 d	A 10,89 d			11,11
BDA	A 12,81 b	A 11,48 c	A 12,34 c	A 11,48 c	A 11,14 e	A 12,07 c			11,88
V8	A 13,14 b	A 12,94 b	A 12,80 c	A 12,71 b	A 12,66 c	A 12,38 c			12,77
FAA	A 13,29 b	A 14,29 b	A 13,92 b	A 12,69 b	A 12,83 b	A 13,85 b			13,47
Média	13,098	12,936	13,272	12,832	12,534	12,842			
Média	A 13,102					A 12,736			
CV %						3,35			

Médias seguidas por mesmas letras maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade do erro.

¹Fotoperíodo= Fotoperíodo 12 luz /12 horas escuro.

extrato de tomate foi indicado por Queiroz & Menezes (1993), como capaz de induzir formação de esporos em *Cercospora nicotianae* Ellis & Everh. Comparando ambos os meios, extrato de tomate mostrou-se mais vantajoso do ponto de vista prático, uma vez que o mesmo é composto por um produto nacional facilmente adquirido.

Segundo Hanada et al., (2002), o regime luminoso que mais influenciou no crescimento micelial do gênero *Cercospora* foi o de escuro contínuo. Porém neste experimento com *C. soja*, o escuro contínuo não apresentou boa esporulação. A inibição parcial da esporulação sob condições de escuro contínuo, foi observada para onze espécies de *Cercospora* por Kilpatrick & Johnson (1956) e também para *C. nicotiana* Ellis & Everh e *Cercospora arachidicola* Hori (STAVELY & NIMMO, 1969).

Para espécies do gênero *Cercospora*, há relatos indicando o efeito positivo da exposição á luz, em regimes alternados com períodos de escuro, sobre a esporulação de isolados de *C. arachidicola* (MORAES & SALGADO, 1997), *Cercospora zea maydis* Tehon & Daniels (BECKMAN & PAYNE, 1983) e *Cercospora kikuchii* (DELA-CUEVA et al, 1997).

Os dados encontrados neste experimento com *C. soja* foram muito semelhantes aos encontrados por Brunelli et al (2006), com *C. zea-maydis*, onde os mesmos relataram que a melhor condição de incubação visando a produção de conídios ocorreu pela associação do regime de 12 horas luz e 12 horas escuro e com os substratos V8 e extrato de tomate.

4 CONCLUSÕES

As maiores esporulações de *C. sojina* são verificadas para os substratos STT e V8.

Quando compara-se fotoperíodo e escuro verifica-se que o primeiro apresenta maior esporulação de *C. sojina*

O substrato AI apresenta o maior diâmetro das colônias, independente da raça de *C. sojina* e regime luminoso, porém, não há relação entre maior diâmetro de colônia com maior esporulação de *C. sojina*.

CAPÍTULO V

INTERAÇÃO DA TEMPERATURA E PERÍODO DE MOLHAMENTO FOLIAR NA INTENSIDADE DA MANCHA FOLIAR “OLHO-DE-RÃ” EM SOJA

JULIANE NICOLODI CAMERA¹

RESUMO – Em experimentos conduzidos em câmaras de crescimento com o cultivar de soja BMX Magna foram avaliadas as interações entre temperaturas e período de molhamento foliar contínuo sobre a intensidade da mancha “olho-de-rã”. As temperaturas testadas foram 15, 20, 25, 30 e 35 °C e os períodos de molhamento foliar de 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas. Cada temperatura constituiu um experimento e os períodos de molhamento foliar, os tratamentos. Observou-se que quando submetidas á 15 °C, as plantas apresentaram sintomas somente com 60 horas de molhamento foliar, para a temperatura de 20 e 25 °C com 24 horas, para a temperatura de 30 °C, com 36 horas e para a temperatura de 35 °C com 48 horas. A maior intensidade da doença foi observada a 30 °C com 72 horas de molhamento foliar. Com molhamento foliar inferiores a 24 horas, não se observou sintomas da doença independentemente das temperaturas testadas. A temperatura ótima para a ocorrência da mancha foliar “olho-de-rã” foi de 27 °C. A intensidade da doença aumentou linearmente a medida que o período de molhamento foliar aumentou.

¹ Engenheira Agrônoma, mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

Palavras-chave: *Glycine max*, *Cercospora sojina*, umidade, calor

ABSTRACT – Interactions between temperatures and continuous periods of leaf wetting on the intensity of the frogeye spot were evaluated in experiments conducted in growth chambers with soybean cultivar BMX Magna. The temperatures tested were 15, 20, 25, 30 and 35 °C and leaf wetting periods of 12, 24, 36, 48, 60 and 72 hours. Each temperature was an experiment and hours of wetting were the treatments. When submitted to 15 °C, the plants showed symptoms only after 60 hours of leaf wetting, at 20 and 25 °C with 24 hours, at 30 °C with 36 hours and at 35 °C with 48 hours. The highest disease intensity was observed at 30 °C with 72 hours of leaf wetting. With leaf wetting lower than 24 hours there was no symptoms regardless of temperatures. For the occurrence of frogeye spot the optimal temperature was 27 °C. Disease intensity increased linearly as the period of leaf wetting increased.

Key words: *Glycine max*, *Cercospora sojina*, humidity, heat

1 INTRODUÇÃO

As culturas, de um modo geral, necessitam de diversos fatores para que as mesmas possam atingir um bom desenvolvimento e produtividade. Dentre os fatores que afetam a produtividade estão às doenças, que podem ser causadas por diferentes agentes etiológicos. Na cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merr.] já foram descritas mais de 40 doenças no Brasil que variam de importância de região para região,

de ano para ano, em função das condições ambientais (FETT 1978; FERREIRA *et al.* 1979). Dentre as doenças que ocorrem na cultura, destaca-se a mancha “olho-de-rã”, cujo agente causal é *Cercospora sojina* Hara.

O aparecimento e desenvolvimento de uma doença são resultantes da interação entre uma planta suscetível, um agente patogênico e ambiente favorável. Desses três componentes, apenas o ambiente apresenta alterações frequentes e importantes no decorrer do ciclo de uma cultura, pois a suscetibilidade do hospedeiro e a virulência/agressividade da população patogênica pouco se altera nesse curto período de tempo. É o ambiente que regula o desenvolvimento das epidemias, podendo, inclusive, impedir sua ocorrência mesmo que hospedeiros suscetíveis e patógenos virulentos estão presentes (AMORIM *et al.*, 2011).

Os fatores do ambiente como umidade, temperatura, nutrição, pH do solo, luz dentre outros, determinam a distribuição geográfica, a incidência e a severidade da doença, sendo em muitos casos específicos para o patógeno em questão (COLHOUN, 1973).

A ocorrência de água líquida sobre a superfície das plantas constitui-se em importante fator de desenvolvimento de doenças. O período de molhamento foliar refere-se ao período de tempo em que a planta permanece molhada (SUTTON *et al.*, 1984). A importância do orvalho para o período de molhamento é acentuada, principalmente quando a precipitação pluvial não é frequente e a quantidade de água líquida permanece sobre as superfícies vegetais durante um tempo relativamente curto.

A temperatura age como catalisador dos processos biológicos, razão pela qual, tanto as plantas como os patógenos requerem uma temperatura mínima para crescer e desenvolver normalmente suas atividades. Com o advento de temperatura mais alta, os patógenos tornam-se ativos e, quando as demais condições se tornam favoráveis, podem infectar as plantas e, conseqüentemente, causar doença (REIS & BRESOLIN, 2004).

Portanto, o manejo das doenças deve ser baseado na modificação de cada um desses fatores ou em suas interações (ZADOKS e SCHEIN, 1979). É de extrema importância o conhecimento das condições favoráveis à infecção e colonização, para o estabelecimento de medidas de controle, visando, desfavorecer o patógeno em quaisquer fases de seu estabelecimento no hospedeiro (AGRIOS, 2004).

Este trabalho teve como objetivo determinar os efeitos da interação entre a temperatura e o período de molhamento foliar sobre a intensidade da mancha foliar “olho-de-rã” em soja.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fitopatologia- Micologia e em câmara de crescimento da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo – Passo Fundo, de março a agosto de 2011. O delineamento experimental usado foi inteiramente casualizados, com cinco repetições, sendo que cada temperatura constitui um experimento, sendo este repetido duas vezes.

As raças de *C. soja* deste experimento foram as mesmas utilizados no trabalho de patogenicidade e virulência, descritos no capítulo 1.

2.1 Isolamento monospórico

Posterior a esporulação de colônias pura do fungo, foi adicionado em cada placa de petri, 10 mL de água destilada e esterilizada com a finalidade de obter-se uma suspensão de conídios. Em seguida, com auxílio de um pincel removeu-se os conídios do meio. Dessa suspensão foi pipetado 1 mL e em seguida colocado em placas de petri contendo ágar-água a 1%. As placas foram incubadas a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas por um período de 12 horas.

Decorrido este tempo observou-se a germinação dos conídios e procedeu-se o isolamento monospórico. Com o auxílio de uma espátula esterilizada foram cortados pequenos cubos de ágar-água contendo um único conídio germinado, observado o mesmo ao microscópio. Cada cubo foi transferido para uma placa de petri com 10 repetições contendo meio de cultura extrato de tomate (HINE & ARAGAKI, 1963). As placas foram incubadas a 25 °C e com fotoperíodo de 12 horas por 30 dias até obter-se esporulação abundante.

2.2 Quantificação de inóculo de *Cercospora soja*

Para a quantificação do inóculo, utilizou-se as três raças de *C. soja* (raça 23, 24 e 25) proveniente do isolamento monospórico

devidamente esporuladas. A concentração para inoculação foi de 40×10^3 conídios.mL⁻¹. Para ajustar essa densidade foi realizada a remoção dos conídios da placas de petri contendo colônias puras de *C. sojina*, com auxílio de pincel, utilizando água destilada e esterilizada. A suspensão obtida foi quantificada, para isso, utilizou-se um micropipetador ajustado para 0,01 mL, e em seguida procedeu-se a contagem de quatro gotas. Cada gota foi considerada uma repetição visando assim, determinar o número de conídios por mL da suspensão.

2.3 Cultivo de plantas de soja e inoculação de *Cercospora sojina*

Plantas de soja dos cultivar BMX Magna foram cultivadas em copos plásticos de 300 mL, utilizando como substrato solo hortado. A densidade de semeadura usada foi de oito sementes por copo. Após a emergência algumas plantas foram eliminadas, permanecendo apenas duas plantas por recipiente. Em seguida estas foram mantidos em câmara climatizada com temperatura de 25 °C e fotoperíodo 12 horas. Quando as plantas encontravam-se em estágio V3 - segunda folha trifoliada completamente desenvolvida (FEHR & CAVINESS, 1977), fez-se a inoculação do fungo através da deposição da suspensão do inóculo com aspersor manual sobre as plantas de soja, até o ponto de escorrimento. Outros cinco copos foram atomizados apenas com água e mantidas sob as mesmas condições ambientais, servindo como testemunhas.

Para o preparo da suspensão de conídios, adicionou-se a duas gotas de espalhante adesivo, Tween 20 (polioxietilenosorbitano) por

litro, para melhorar sua distribuição dos conídios nas plantas durante a inoculação.

2.4 Período de molhamento foliar das plantas de soja

Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida propiciada por abrigos plásticos individuais para cada tratamento. Os abrigos possuíam um aspersor em sua parte superior para garantir o molhamento contínuo pelo período o qual correspondia os tratamentos na temperatura desejada. Um temporizador eletrônico ligava o motor elétrico da bomba de pressão a intervalos de 6,0 horas e por um período de 1,0 minuto. Ao término de cada período as plantas foram secadas com auxílio de um ventilador e transferidas para outra câmara climatizada com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas.

As temperaturas avaliadas neste trabalho foram de 15, 20, 25, 30 e 35 °C e o período de molhamento foliar foi de 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas. Cada temperatura constituiu um experimento sendo as diferentes horas de molhamento, os tratamentos. Aos quinze dias após a incubação foram avaliados apenas o último trifólio totalmente expandido da planta, com relação as seguintes variáveis:

Incidência: refere-se ao número de folhas doentes em relação ao total de folhas, para isso atribuiu-se notas de 0% a 100% de incidência.

Severidade estimada: refere-se a porcentagem de folhas doentes em relação a área total da folha e para isso atribuiu-se notas de 0% a 100% de severidade.

Número de lesões: nos folíolos onde atribuiu-se notas de severidade contou-se o número lesões.

Diâmetro das lesões: mediu-se com o auxílio de um paquímetro digital o diâmetro de quatro lesões do fóliolo avaliado anteriormente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que quando submetidas a temperatura de 15 °C, as plantas apresentaram incidência da doença somente com 60 horas de molhamento foliar (Tabela 1), para a temperatura de 20 e 25 °C com 24 horas, para a temperatura de 30 °C com 36 horas e para a temperatura de 35 °C com 48 horas. A maior incidência da doença foi observada a 30 °C com 72 horas de molhamento foliar.

Com molhamento foliar inferiores a 24 horas, não se observou incidência da doença independentemente das temperaturas testadas.

Tabela 1 - Efeito da temperatura e do período de molhamento foliar sobre a incidência (%) das plantas de soja. Passo Fundo, RS. 2011

Período de molhamento foliar	Temperatura (°C)				
	15	20	25	30	35
	Incidência (%)				
12	0	0	0	0	0
24	0	100	100	0	0
36	0	100	100	100	0
48	0	100	100	100	100
60	100	100	100	100	100
72	100	100	100	100	100

Dados semelhantes aos da incidência da mancha foliar “olho-de-rã” foram observados para severidade (Tabela 2), número de lesões por folíolo (Tabela 3) e diâmetro de lesões por folíolo (Tabela 4). Verificou-se que, à medida que aumentou a temperatura e o período de molhamento foliar se aumentou a intensidade da doença.

Tabela 2 - Efeito da temperatura e do período de molhamento foliar sobre a severidade estimada (%) dos folíolos de soja. Passo Fundo, RS. 2011

Período de molhamento foliar	Temperatura (°C)				
	15	20	25	30	35
	Severidade (%)				
12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
24	0,00	0,04	0,01	0,00	0,00
36	0,00	0,09	0,13	0,05	0,00
48	0,00	0,10	0,48	1,17	0,05
60	0,02	0,50	1,78	1,77	1,28
72	0,28	0,63	3,50	3,45	1,48

Tabela 3 - Efeito de temperaturas e período de molhamento foliar sobre número de lesões por folíolo. Passo Fundo, RS. 2011

Período de molhamento foliar	Temperatura (°C)				
	15	20	25	30	35
	Número de lesões por folíolo				
12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
24	0,00	0,10	0,03	0,00	0,00
36	0,00	0,15	0,17	0,07	0,00
48	0,00	0,23	0,57	2,83	0,05
60	0,03	0,62	3,63	4,83	2,43
72	0,48	1,15	6,10	5,90	2,90

Tabela 4 - Efeito da temperatura e do período de molhamento foliar sobre diâmetro de lesões (mm) dos folíolos de soja. Passo Fundo, RS. 2011

Período de molhamento foliar	Temperatura (°C)				
	15	20	25	30	35
	Diâmetro de lesão (mm) por folíolo				
12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
24	0,00	0,06	0,03	0,00	0,00
36	0,00	0,08	0,16	0,03	0,00
48	0,00	0,09	0,21	0,41	0,02
60	0,03	0,35	0,34	0,49	0,48
72	0,09	0,36	0,72	1,04	0,62

Com relação ao período de molhamento foliar, para a severidade da mancha foliar “olho-de-rã” (Figura 1), número de lesões

por folíolo (Figura 2) e diâmetro de lesões (Figura 3), observou-se que a intensidade da doença aumentou linearmente a medida que o período de molhamento foliar aumentou.

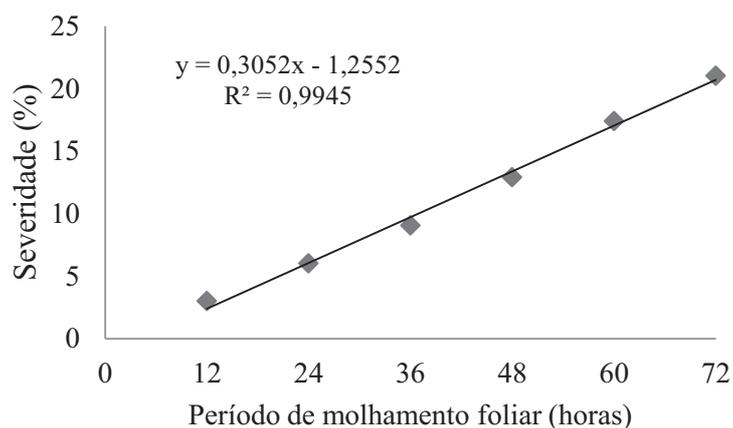


Figura 1 - Severidade estimada de *Cercospora soja* no cultivar de soja BMX Magna. Cada ponto representa a média de cinco repetições. Passo Fundo, RS. 2011.

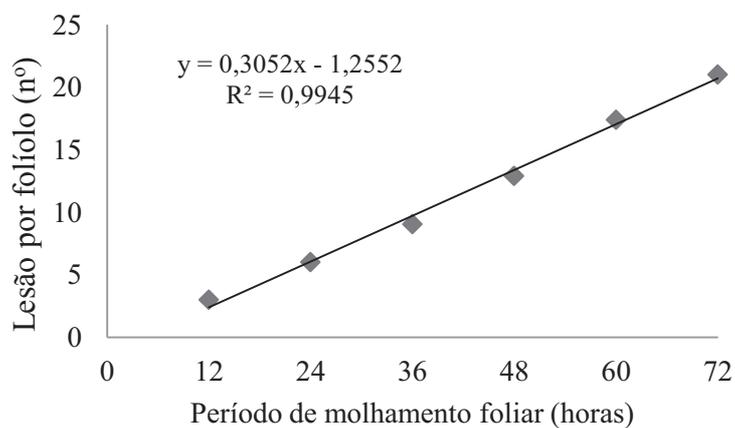


Figura 2 – Número de lesões por folíolo de *Cercospora soja* no cultivar de soja BM Magna. Cada ponto representa a média de cinco repetições. Passo Fundo, RS. 2011.

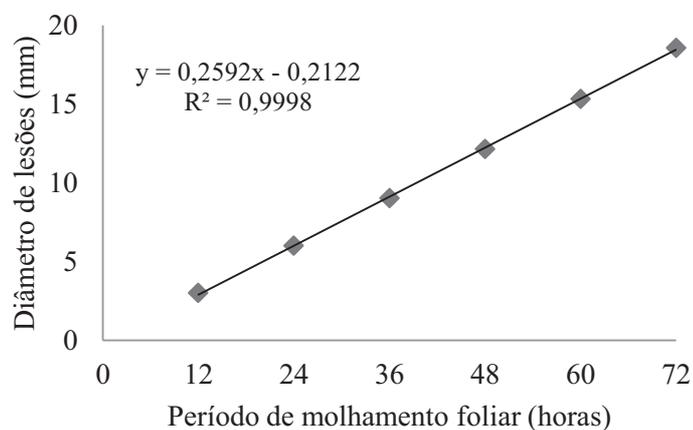


Figura 3 – Diâmetro de lesões por folíolo (mm) de *Cercospora sojina* no cultivar de soja BMX Magna. Cada ponto representa a média de cinco repetições. Passo Fundo, RS. 2011.

A severidade da mancha foliar “olho-de-rã” (Figura 4), número de lesões por folíolo (Figura 5) e diâmetro de lesões (Figura 6) de todas as temperaturas foram representadas por equações polinomiais quadrática. Calculou-se a partir das fórmulas de regressão, a temperatura ótima para cada uma das variáveis avaliadas. Para severidade, a melhor temperatura foi de 27 °C (Figura 4), para número de lesões por folíolo foi de 28 °C (Figura 5) e para diâmetro de lesões foi de 27 °C (Figura 6). Para todas as variáveis, verificou-se que após a temperatura ótima a intensidade da doença diminuiu.

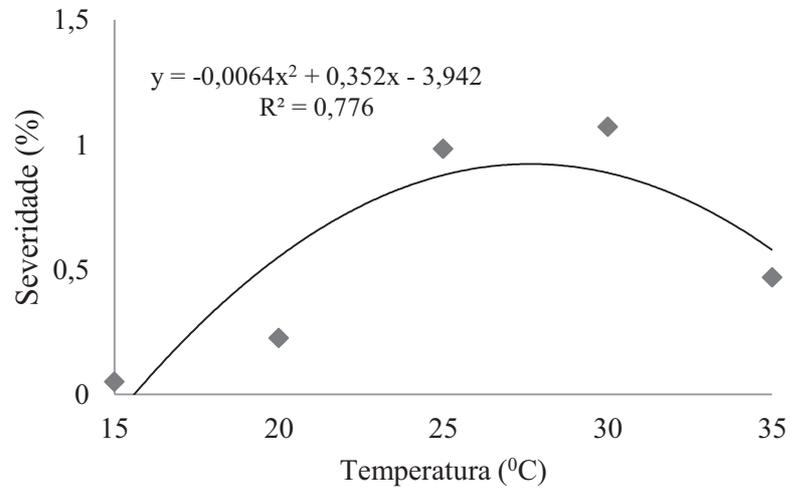


Figura 4 - Severidade estimada de *Cercospora soja* no cultivar de soja BMX Magna. Cada ponto representa a média de cinco repetições. Passo Fundo, RS. 2011

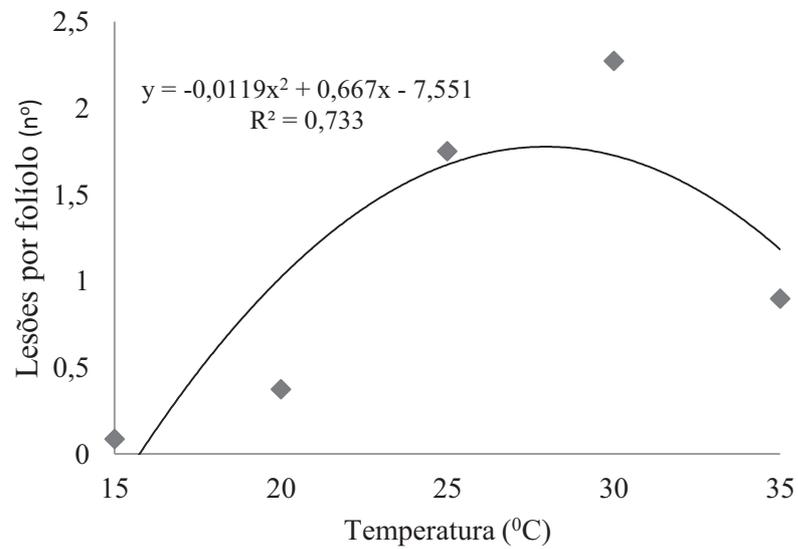


Figura 5 – Número de lesões por folíolo de *Cercospora soja* no cultivar de soja BMX Magna. Cada ponto representa a média de cinco repetições. Passo Fundo, RS. 2011

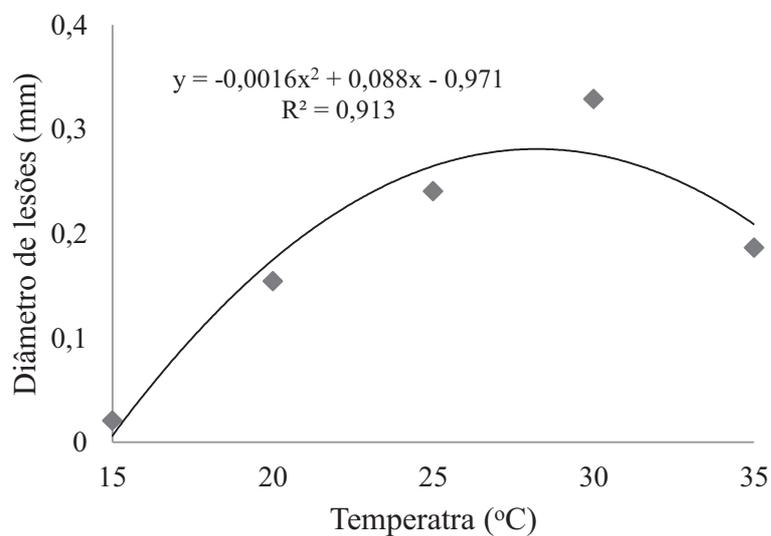


Figura 6 – Diâmetro de lesões por folíolo (mm) de *Cercospora sojina* no cultivar de soja BMX Magna. Cada ponto representa a média de cinco repetições. Passo Fundo, RS. 2011

Fez-se a combinação entre o período de molhamento foliar (horas) e a temperatura (°C) com a finalidade de gerar gráficos de superfície de resposta com todas as variáveis avaliadas severidade (Figura 8), número de lesões por folíolo (Figura 9) e diâmetro de lesões por folíolo (Figura 10).

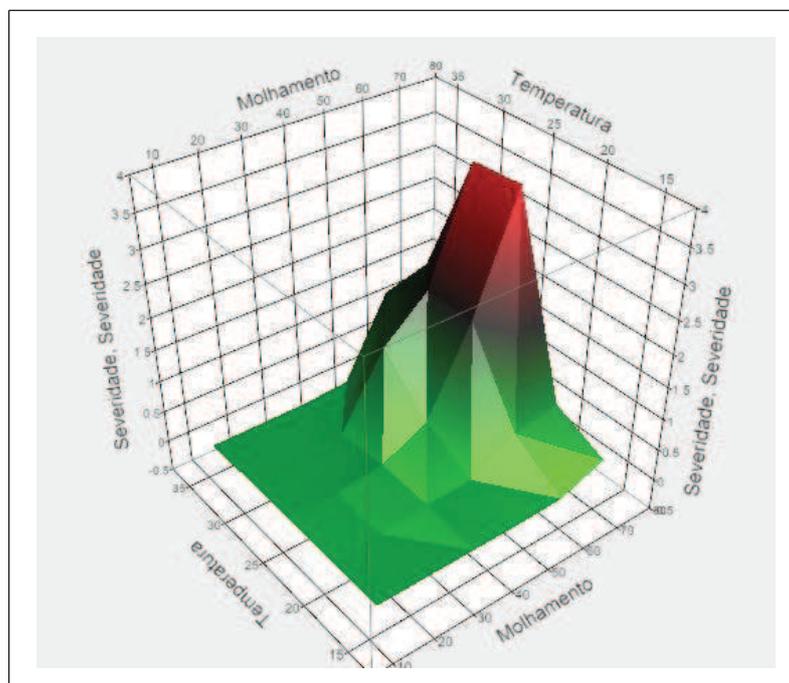


Figura 7 – Superfície de resposta da interação entre período de molhamento foliar [horas] e a temperatura [T°C] sobre a severidade estimada (%) de *Cercospora sojina* no cultivar de soja BMX Magna. Passo Fundo, RS. 2011

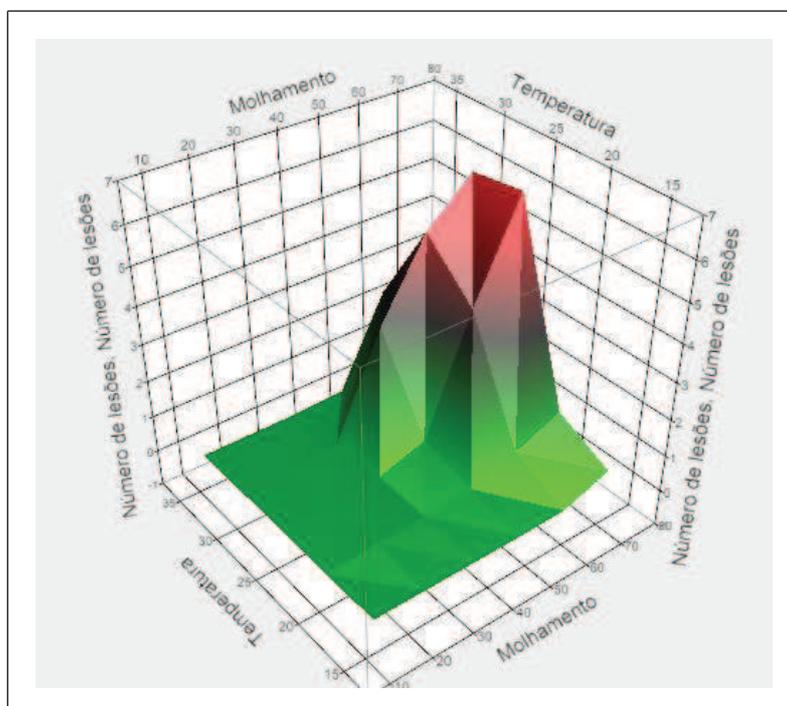


Figura 8 – Superfície de resposta da interação entre período de molhamento foliar [horas] e a temperatura [T°C] sobre número de lesões por folíolo de *Cercospora soja* no cultivar de soja BMX Magna. Passo Fundo, RS. 2011

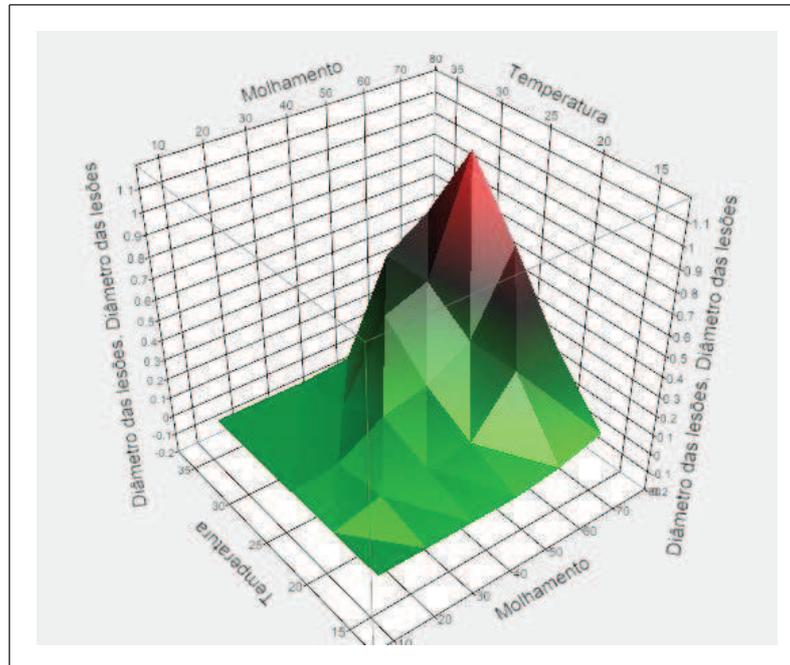


Figura 9 – Superfície de resposta da interação entre período de molhamento foliar [horas] e a temperatura [T°C] sobre diâmetro de lesões por folíolo (mm) de *Cercospora soja* no cultivar de soja BMX Magna. Passo Fundo, RS. 2011

É fundamental conhecer o período crítico (PC) para cada patossistema, que é um período de tempo (horas) identificável durante o qual, as condições são favoráveis à infecção. Ou seja, corresponde ao número de horas em que os sítios de infecção devem permanecer continuamente molhados, e uma dada temperatura, para que ocorra a germinação dos esporos, de penetração e de estabelecimento do parasitismo (REIS & WORDELL FILHO, 2004).

Segundo Zadoks & Schein (1979), diferentes intensidades de uma doença são obtidas utilizando-se diferentes concentrações de inóculo, temperaturas e períodos de molhamento foliar. Sendo a interação da temperatura com o período de molhamento foliar um item fundamental para ocorrência e intensidade das doenças. O período de molhamento foliar e a temperatura são alguns dos fatores ambientais que podem afetar as relações patógeno-hospedeiro (REIS et al., 1988). Cada indivíduo necessita de período de molhamento foliar e de temperatura distintos para completar com sucesso a infecção (SUTTON, 1988).

Os dados encontrados neste trabalho, com relação a temperatura estão de acordo com os descritos por Cruz (2008), no qual mostra que a temperatura ideal para o desenvolvimento de *C. sojina* é de 25 °C e limitada quando a temperatura é superior á 32 °C. Trabalho realizado por Yorinori (1989) com este mesmo patossistema mostra que a germinação deste fungo é interferida quando as temperaturas encontrarem-se abaixo de 20 °C.

Segundo JULIATTI et al., (2004) a infecção de *P. pachyrhizi* que ocorre juntamente com *C. sojina* em soja desenvolvem-se em temperaturas entre 15 e 28 °C e umidade relativa do ar entre 75 e 80%, sendo períodos prolongados de orvalho são favoráveis para o desenvolvimento da doença na lavoura.

A presença do molhamento foliar é um fator determinante para a ocorrência da doença, sendo que a presença ou ausência da água livre na superfície foliar determina à possibilidade de germinação dos esporos e conseqüentemente, a ocorrência da doença (MARCHETTI et al.,1976). Quando refere-se ao período de

molhamento foliar Veiga (1973), descreve que 48 horas de molhamento foliar podem causar infecção da mancha “olho-de-rã”. Kudo (2009) trabalhando com *C. sojina* em soja utilizou em seu trabalho 72 horas de molhamento foliar, obtendo intensidade da doença que possibilitou a seleção de genótipos de soja. Segundo Scandiani et al (2010) em estudos de suscetibilidade de genótipos à *C. sojina*, as plantas de soja foram inoculadas e mantidas em câmara úmida por 72 horas com temperatura média de 26 °C. Nesta situação a inoculação foi bem-sucedida demonstrando os primeiros sintomas da doença em 8 dias após a inoculação.

As informações obtidas na interação entre temperatura e período de molhamento foliar permitem um maior conhecimento da epidemiologia da doença, podendo essas informações ser utilizadas para compor um sistema de previsão da mancha “olho-de-rã”, além de se poder utilizar no manejo da doença.

4 CONCLUSÕES

A temperatura ótima para a ocorrência de *C. sojina* é de 27 °C, representadas por equações polinomiais quadráticas.

A intensidade da doença aumenta linearmente à medida que o período de molhamento foliar aumenta, sendo 72 horas mais favorável para a ocorrência da mancha foliar “olho-de-rã”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. 1994.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. & BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*. 4th ed. John Wiley, New York. 1996. 870 p.

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

ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F.V.; HENNING, A.A.; GODOY, C.V.; COSTAMILAN, L.M.; MEYER, M.C. Doenças da Soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Eds.) *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, 2005.p. 569-588.

ALMEIDA, A.M. R.; YAMASHITA, J. Crescimento e esporulação de *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei em diferentes meio de cultura. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, vol. n°1, p. 203 -206. 1976.

AMORIM, L.; BEDENDO, I. P. Ambiente e doença. In: REZENDE, J. A.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; M. (Ed.) *Manual de fitopatologia*. 4.ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. 704p 133-146.

AMORIM, L. Colonização e Reprodução. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; *Manual de fitopatologia*. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p. 309-330.

ATHOW, K.L. Fungal diseases. In: CALDWELL, B.E. (Ed). Soybean: improvement, production and uses. [S.1.]: *American Society of Agronomy*, 1983.9.459-489.

BARBA, J.T. *Bipolaris sorokiniana* (*Cochliobolus sativus*) em sementes de cevada: detecção, transmissão e controle. 2000 .196 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia e

Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2000.

BECKMAN, P.M.; PAYNE, G.A. *A cultura techniques and conditions influencing growth and sporulation fo Cercospora zae maydis and lesions development in corn* *Phytopathology*, St. Paul, v. 73, n. 3, p. 286-289, 1983.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. *Doenças de Plantas Tropicais: Epidemiologia e Controle Econômico*. São Paulo. Ceres. 1996.

BLANEY, C.L. *Fungal pathogens with potential for biocontrol of yellow nutsedge (Cyperus esculentus L.)* 1987. 41 f. Dissertação (Master of Science) – Departament of Botany. North Carolina State University Raleigh.

BONATO, E.R. *Estresses em soja*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. 254p.

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

BRUNELLI, K.R.; FAZZA, A.C. Athayde Sobrinho C, Camargo LEA Efeito do meio de cultura e do regime de luz na esporulação de *Cercospora zae-maydis*. *Summa Phytopathol* 32: 92-94. 2006.

CARLILE, M.J.; WATKINSON, S.C. *The fungi*. San Diego: Academic, 1994. 428 p.

CARLINI, R. de C. *Germinação de uredosporos e período latente de phakopsora pachyrhizi determinado por tempo cronológico unidades de calor*. 2009.63 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2009.

CARMONA, M. *La rotacion de cultivos y el monocultivo de soja*. In: *Plagas y enfermedades en manejo organico*. Fogueiman D. (comp). MAPO, GTZ y PREDEG. (Eds). 2003 p .82-87.

CARMONA, M.; SCANDIANI, M.; LUQUE, A. 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.

CARVALHO, E.A. de C. *Avaliação agronômica da disponibilização de nitrogênio à cultura de feijão sob sistema de semeadura direta*. Piracicaba-SP: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2002. Tese de doutorado.

CARVALHO, L.P.; CARVALHO, J.M.F.C.; LIMA, E.F.; CAVALCANTE, F.B. Influência da concentração de esporos da patogenicidade de *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* A. S. Costa e avaliação da resistência de cultivares e linhagens de algodoeiro herbáceo à ramulose. *Fitopatologia Brasileira* 6:395-402. 1981.

COLHOUN, J. Effects of environmental factors on plant disease. *Annual Review of Phytopathology* 11:343-364. 1973.

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. *Estimativas de safras da produtividade brasileira da safra 2010/2011*. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 02 de maio de 2011.

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

CRUZ, C.D.; DORRANCE, A.E. Characterization and survival of *Cercospora sojina* in Ohio. *Plant Health* 2009. Plant Management Network (online), 2009.

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

DALLA PRIA, M.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Quantificação de componentes monociclícos da mancha angular do feijoeiro. *Fitopatologia Brasileira* 28:394-400. 2003.

DELA-CUEVA, F.M.; NATURAL, M.P.; HAUTEA, R.A. Cultural requerimentos for maximum conidial production of *Cercospora kikuchii*, the cause of purple seed stain of soybean. *Philippine Phytopathology*, Laguna, v. 31, p. 20-26, 1997.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. *Basic Plant Pathology Methods*. 2. ed. Boca Raton: CRC Press. Inc., 1995. LEACH, C. M. Sporulation of diverse species of fungi under near ultraviolet radiation. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.40, n.1, p. 151-161, 1962.

DOMAGALSKI, J.M.; KOLLIPARA, K.P.; BATES, A.H. et AL. Nulls for the major soybean Bowman-Birk protease inhibitor in the genus *Glycine*. *Crop Science*, v. 32, p. 1502-1505, 1992.

EMBRAPA. Tecnologia de produção de soja – região central do Brasil. *Sistemas de produção / Embrapa Soja*, Londrina, n. 12, p. 1677-8499, 2008.

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

FEHR, W.R., CAVINESS, C.E. *Stages of soybean development*. Ames: Iowa State University, 1977. 12p. (Special Report, 80).

FERNANDES, C.F. *Expressão de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo e ao mecanismo de defesa do feijão-de-corda [Vigna unguiculata (L.) Walp.] ao fungo Colletotrichum lindemuthianum (Sacc. & Magn.) Briosi & Cav*. Tese de Doutorado em Bioquímica. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza, 162p. 2004.

FERNANDES, C. D.; DEL PELOSO, M. C.; MAFFIA, L. A.; DO VALLE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. Influência da concentração de inóculo de *Cercospora coffeicola* e do período de molhamento foliar na intensidade da cercosporiose do cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* 16:39-43. 1991.

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

FERREIRA, L.P.; LEHMAN, P.S.; ALMEIDA, A.M.R. *Doenças de Soja no Brasil*. CNPs - Embrapa. 42p. (Circular técnica 1) 1979.

FETT, W.F. Volunteer soybean: survival sites for soybean pathogens between seasons in southern Brazil. *Plant Disease Reporter*, 62:1013-16. 1978.

GARRAWAY, M.O.; EVANS, R.C. *Fungal nutrition and physiology*. New York: J. Wiley, 1984. 401 p.

GÓMEZ, D.E. *Cercospora sojina: produção de esporos, densidade de inóculo e reação de cultivares de soja*. 2011.94 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2011.

HANADA, R.E.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J.C.R. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.27, n.2, p.170-173, 2002.

HAWKER, L.E. *The physiology of reproduction in fungi*. Cambridge: Cambridge University Press, 1957. 128p.

HENNING, A.A.; GODOY, C.V. Situação da ferrugem da soja no Brasil e no mundo. In.: ZAMBOLIM, L. *Manejo integrado da ferrugem asiática da soja*. Viçosa: UFV, DFP, 2006. 140p.

HINE, R.B.; ARAGAKI, M. Influence of soil temperature on a crown rot disease of parsley caused by *Phytophthora parasitic*. *Phytopathology* 53:1113-1114. 1963.

JONES, J.P. Survival of *Cercospora kikuchii* on soybean system in the field. *Plant Disease Report* . St. Paulo, v.52, p.931-934. 1968.

JULIATTI, F.C.; POLIZEL, C.A.; JULIATTI, F.C. *Manejo integrado de doenças na cultura da soja*, Uberlândia: EDUFU, 2004, 327 p.

KILPATRICK, R. A.; JOHNSON, H. W. Sporulation of *Cercospora* species on carrot leaf decoction agar. *Phytopathology* 46: 180-181. 1956.

KUDO, A.S; BLUM, L.E.B.; LIMA, M.A. Aerobiologia de *Cercospora kikuchii*. *Cienc. Rural*. vol.41, n.10, p. 1682-1688, 2011.

LEHMAN, S.G. *Frog-eye leaf spot on soybean caused by Cercospora diazu* Miura. *J. Agric. Res.*36:811-833, 1928.

LILLY, V.G.; BARNETT, H.L. *Physiology of the fungi*. New York: McGraw-Hill Book, 1951. 464 p.

LUKENS, R.J. Photo-inhibition of sporulation in *Alternaria solani*. *American Journal of Botany*, New York, v.50, n.7, p.721-724, 1963.

MARCHETTI, M.A.; MELCHING, J.S.; BROMFIELD, K.R. The effects of temperature and dew period on germination and infection by uredospores of *Phakopsora pachyrhizi*, *Phytopathology*, Sait Paul, v. 66, p. 461-463. 1976.

MAUDE, R.B. *Seed Borne Diseases and Their Control: Principles and Practice*. CBA International, Cambridge, U.K., 280 pp. 1996.

MENGISTU, A.; KURTZWELL, N.C.; GRAU, C.R. First Report of Frogeye leaf Spot (*Cercospora sojina*) in Wisconsin. *Plant Dis.* 86(11):1272, 2002.

MIAN, M.A.; MISSAOUI, A.M.; WALKER, D.R.; PHILLIPS, D.V.; BOERMA, H.R. Frogeye leaf spot of soybean: A review and proposed race designations for isolates of *Cercospora sojina* Hara. *Crop Science*. 48:14-24. 2008.

MINUSSI, E.; MACHADO, C.C., MENTEN, J.O.M., CASTRO, C., KIMATI, H. Efeitos de diferentes regimes de luz na esporulação de *Stemphilum solani* Weber em meio de cultura. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.2, n.2, p. 167-171, 1977.

MISSÃO, M.R. Soja: origem, classificação e uma visão abrangente de mercado. *Maringá Management: Revista de Ciências Empresariais*, Maringá, v. 3, n. 1, p.7-15, 2006.

MORAES, S.; SALGADO, C.L. Influência da luz sobre a esporulação de *Cercospora arachidicola* Hori. *Summa Phytopathologica*, Jaguariúna, v. 4, p. 128-135, 1978.

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

PHILLIPS, O.V. Frogeye leaf spot. In: *Compendium of Soybean Diseases*. 4th ed. G.L. Hartman, J.B. Sinclair, and J.C. Rupe. APS Press, St. Paul, MN. pp. 20-21, 1999.

PLOPER, L.D.; GONZALEZ, V.; GALVEZ, R.; DEVANI, M. ; LEDESMA, F. *La mancha ojo de rana. Outra enfermedad limitante del cultivo de la soja*. *Avance Agroindustrial* Vol 21, N° 2:9-12, 2000.

QUEIROZ, F.M.; MENEZES, M. Efeito de meios de cultura e do regime de luz na esporulação de *Cercospora nicotianae*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.18, n.4, p.545-547, 1993.

REIS, E.M.; BRESOLIN, A.C. R. Sistemas de previsão de doenças de plantas. In: REIS, E.M. *Previsão de doenças de plantas*. Passo Fundo: UPF, 2004. p. 155-287.

REIS, E.M.; WORDELL, Filho J.A. Previsão de doenças de plantas. In: REIS, E.M. *Previsão de doenças de plantas*. Passo Fundo: UPF, 2004. p. 65-99.

REIS, E.M.; FERNANDEZ, J.M.C.; PICININI, E.C. *Estratégias para o controle de doenças do trigo*. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1988. 50p. (EMBRAPA-CNPT. Documentos, 7).

REIS, E.M. Mancha “olho-der-rã” em soja. *Revista Instituto Rio Grandense do arroz, Lavoura Arrozeria*, v. 279, p. 4/8. 1974.

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

REUNIÃO DE PESQUISA DA SOJA DA REGIÃO SUL (38.: 2010: Cruz Alta, RS). *Indicações técnicas para a cultura da soja no Rio grande do Sul e em Santa Catarina 2010/2011 e 2011/2012*. Cruz Alta, RS: FUNDACEP FECOTRIGO, 2010. 168p.

SCANDIANI M.M, FERRARI B, FORMENTO N, LUQUE A, CARMONA M, TARTABINI M, FERRI M. Evaluación de la resistencia y susceptibilidad de genotipos de soja (*Glycine max*) a la mancha ojo de rana (*Cercospora sojina*). *Revista Análisis de Semillas* 4(14):67-72. 2010.

SCANDIANI, M.M.; FERRI, M.; CARMONA, M.A.; RUBERTI, D.S.; LUQUE, A. y Tartabini, *Presencia de Cercospora sojina Hara en semillas de soja*. Métodos para su detección. Trabajo a presentar en la XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas, 1 y 2 de octubre de 2009, Santiago del Estero.

SILVA, J.F. *Contribuição ao desenvolvimento de soja com resistência a patógenos*. (Embrapa Soja Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 1). Londrina: Embrapa Soja, 2002.

SINCLAIR, J.B.; BACKMAN, P.A.(Eds.). Frogeye leaf spot. In: Compendium of soybean diseases. *American Phytopathological Society*, St. Paul, Minnesota, USA. 1924. 1989

STAVELY, J.R.; NIMMO, J.A. Effects of temperature upon growth and sporulation of *Cercospora nicotianae*. *Phytopathology* 59: 496 - 498. 1969.

STRANDBERG, J.O. Isolation, storage, and inoculum production methods for *Alternaria dauci*. *Phytopathology*, St. Paul, v.77, n.7, p.1008- 1012, 1987.

SUTTON, J.C. Predictive value of weather variables in the epidemiology and management of foliar diseases. *Fitopatologia Brasileira* 13:305-312. 1988.

SUTTON, J.C.; GILLESPIE, T.J.; HILDBRAND, P. Monitoring weather factors in relation to plant disease. *Plant Disease*. v. 68, n. 1, p. 78-84. 1984.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TEIXEIRA, H; CHITARRA, L.G.; ARIAS, S.M.S.; MACHADO, J.C. Efeito de diferentes fontes de luz no crescimento e esporulação *in vitro* de fungos fitopatogênicos. *Ciência Agrotécnica*, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1314-1320, 2001.

TELES NETO, F. *Transmissão e controle de Fusarium graminearum em sementes e danos causados pela giberela em trigo*. Dissertação, (Mestrado 112 em Agronomia/Fitopatologia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2004.

THEISEN, G.; RUEDELL, J. *Tecnologia de aplicação de herbicidas: teoria e prática*. Passo Fundo: Aldeia Norte, 2004. 90p.

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

VEIGA, P. *Cercospora sojina* Hara: *Obtenção de inóculo, inoculação e avaliação da resistência em soja [Glycine max (L.) Merr.]*. Dissertação de mestrado. ESALQ – Piracicaba 1973. 32p.

VIDAL, R.A.; FLECK, N.G. Absorção e translocação de defensivos agrícolas. In: BORGES, L.D. *Tecnologia de aplicação de defensivos agrícolas*. Passo Fundo: Plantio Direto Eventos, 2006. p.57-70.

YORINORI, J.T.; KLINGELFUSS, L.H. Novas raças de *Cercospora sojina* em soja. *Fitopatologia Brasileira*, 24:509-12, 2000.

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. 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.

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

APÊNDICES

1. 0 Apêndice

Receita meio de cultura:

Extrato de tomate ágar (Hine & Aragaki, 1963)

- * Massa de tomate (Jurema): 40 mL (40 g em 1 litro de água)
- * Carbonato ou cloreto de cálcio: 0,6 g
- * Extrato de levedura: 0,2 g
- * Sacarose: 1 g
- * Ágar: 20 g (o meio tem que ser bem firme)

PREPARO:

- a. Pesar o extrato de levedura, sacarose e ágar, e colocar em Erlenmeyer;
- b. Em 1 L de água destilada colocar 40 g de massa de tomate e o carbonato de cálcio, deixar no fogo até levantar fervura, e em seguida misturar no Erlenmeyer com os outros ingredientes e autoclavar por 30 min;