



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MAYRA SUEMY ISHIKAWA

**METODOLOGIAS DE SELEÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA
PARA RESISTÊNCIA AO MOFO-BRANCO E À PODRIDÃO-
DE-CARVÃO E AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE
*Sclerotinia sclerotiorum***

MAYRA SUEMY ISHIKAWA

**METODOLOGIAS DE SELEÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA
PARA RESISTÊNCIA AO MOFO-BRANCO E À PODRIDÃO-
DE-CARVÃO E AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE
*Sclerotinia sclerotiorum***

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em
Agronomia da Universidade Estadual de Londrina,
para a obtenção do título de Doutora em Agronomia.

Orientadora: Profa Dra Maria Isabel Balbi Peña
Coorientadora: Dra Neucimara Rodrigues Ribeiro

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Ishuikawa, Mayra Suemy.

Metodologias de seleção de cultivares de soja para resistência ao mofo-branco e à podridão-de-carvão e agressividade de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* / Mayra Suemy Ishuikawa. - Londrina, 2018.
205 f.

Orientador: Maria Isabel Balbi Peña.

Coorientador: Neucimara Rodrigues Ribeiro.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Soja - Resistência a doenças e pragas - Tese. 2. Sclerotinia - Tese. 3. Inoculação - Tese. 4. Fitopatologia - Tese. I. Peña, Maria Isabel Balbi. II. Ribeiro, Neucimara Rodrigues. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

MAYRA SUEMY ISHIKAWA

**METODOLOGIAS DE SELEÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA PARA
RESISTÊNCIA AO MOFO-BRANCO E À PODRIDÃO-DE-CARVÃO E
AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Sclerotinia sclerotiorum***

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em
Agronomia da Universidade Estadual de Londrina,
para a obtenção do título de Doutora em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Balbi Peña
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Coorientadora: Dra Neucimara Rodrigues Ribeiro
Faculdade de Mato Grosso do Sul – FACSUL

Dra. Claudia Vieira Godoy
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária –
Embrapa Soja

Prof. Dr. Dauri José Tessmann
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Profa. Dra. Inês Cristina de Batista Fonseca
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Ciro Hideki Sumida
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 28 de fevereiro de 2018

À memória de Fernando Kikuchi Rodini, com quem tive o privilégio de compartilhar ótimos anos e inesquecíveis momentos; quem se faz continuamente presente nos saudosos sorrisos trazidos pelas eternas lembranças, dedico.

AGRADECIMENTOS

A conclusão desta tese é imensamente gratificante, e não seria possível sem a colaboração de muitos envolvidos, aos quais deixo meus sinceros agradecimentos.

Agradeço pela minha vida, saúde e disposição para realizar todas as etapas deste trabalho, durante estes quatro anos, e superação frente aos momentos difíceis.

Agradeço à minha família, que me incentivou na continuidade dos estudos, dando sempre todo o suporte necessário para tanto. Aos meus pais, especialmente, pelos exemplos e ensinamentos de integridade, dedicação e responsabilidade, tão importantes em todos os aspectos da minha vida, e não menos nesta etapa que concluo, ficam meu amor e gratidão imensuráveis.

À Universidade Estadual de Londrina, sobretudo ao Departamento de Agronomia, que tão bem me acolheram desde a graduação. Onde, e quando, passei os anos mais intensos da vida, crescendo e aprendendo lições de convivência, diferenças, paciência, independência, vivendo alegrias, desesperos, superações, e, também, momentos de interação e diversão. Aqui, fiz amizades incríveis que levarei para sempre.

Agradeço aos docentes, muitos já aposentados, pois são os maiores incentivadores e exemplos para seguirmos estudando. Em particular, fica minha imensa gratidão ao professor Seiji Igarashi. O estágio e trabalho com ele e sua equipe, mesmo nos períodos de férias, foram gratificantes e fundamentais para o meu conhecimento, principalmente prático, da fitopatologia. Quero destacar ainda, minha admiração pelo sua humildade, criatividade e amor à profissão, que procurarei levar como lição por onde passar. Obrigada!

À professora Maria Isabel Balbi-Peña, orientadora desta tese, pela amizade, confiança, interesse, solicitude, críticas, sugestões, puxões de orelha e, principalmente pela liberdade concedida na condução deste trabalho, abertura ao receber minhas ideias, e pelo rigor nas correções prévias, essenciais para melhoria da tese.

À Empresa GMD Genética do Brasil, parceira neste projeto, que forneceu todo o suporte para realização dos ensaios: material, estrutura física, auxílio de mão de obra e viagens para avaliações de ensaios de campo. Sobretudo, sou grata pelas amizades que lá fiz, e pela impagável oportunidade de conhecimento, vivenciando a rotina de ensaios de seleção de genótipos de soja para inúmeros patógenos e, inclusive, nematoides.

À gerente de sanidade da referida empresa, Neucimara Rodrigues Ribeiro, coorientadora desta tese, admirável mulher e profissional, agradeço pela amizade, confiança e disponibilidade, ainda que sempre muito atarefada. Obrigada pela receptividade, por não medir esforços para realização deste trabalho, e pelos animados momentos de gargalhadas, que não foram poucos!

Agradeço a disponibilidade dos componentes da banca examinadora deste trabalho, pesquisadores especialmente elencados, pelas considerações observadas, para o aperfeiçoamento e enriquecimento do mesmo. Gratidão especial à Inês Cristina de Batista Fonseca, professora na graduação e pós, orientadora no mestrado, amiga e participantes na banca de defesa desta tese, pela disponibilidade e ajuda nas análises estatísticas do mesmo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos amigos verdadeiros, muitos de longa data, sejam da infância, do colégio, da agronomia, dos acasos. Agradeço o carinho, cuidado e o interesse pelos meus passos, vocês são essenciais! Especialmente, sou grata aos amigos Giovani Arieira, Cesar Sbrussi, Naira Cuareli de Moura, que vieram com a graduação, continuaram no mestrado e doutorado, e permanecerão por toda a vida, apesar dos caminhos que as vidas tomam. Obrigada pela parceria nos momentos de estudo e dificuldades, e nos inúmeros e impagáveis momentos de descontração e conversas necessárias. Contem sempre comigo!

Quero deixar ainda, agradecimento singular às amigas Camila Nishimura e Adriély Alves de Almeida, de não tão longa data, mas não menos importantes. Minhas companheiras da pós-graduação, nas alegrias e angústias, com quem convivi diária e intensamente, aprendendo ou ensinando, e sempre compartilhando. Obrigada pela irmandade e por participarem ativamente desta conquista. Vocês foram primordiais, não haveria melhores parceiras para esta trajetória!

Aos que me apoiaram e aos demais colaboradores, diretos ou indiretos, envolvidos na realização deste trabalho, meu muito obrigada!

*“Dou respeito às coisas desimportantes
e aos seres desimportantes.
Prezo insetos mais que aviões.
Prezo a velocidade das tartarugas mais
que a dos mísseis.
Tenho em mim esse atraso de nascença.
Eu fui aparelhado para gostar de passarinhos.
Tenho abundância de ser feliz por isso.
Meu quintal é maior do que o mundo”*

(Manoel de Barros)

ISHIKAWA, Mayra Suemy. **Metodologias de seleção de cultivares de soja para resistência ao mofo-branco e à podridão-de-carvão e agressividade de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum***. 2018. 105f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2018.

RESUMO

A doença mofo-branco da soja tem como agente causal o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, enquanto a podridão-de-carvão, é causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. Ambos os patógenos são considerados cosmopolitas e polípagos, apresentando ampla gama de hospedeiros, entre eles, muitas espécies cultivadas. Têm como característica principal a formação de estruturas de sobrevivência denominados escleródios que garantem sua sobrevivência no solo por longos períodos, dificultando o controle. *S. sclerotiorum* é um patógeno agressivo, que causa severos danos em condições de alta umidade e temperaturas amenas; por outro lado, *M. phaseolina* é um habitante natural do solo, que vem ganhando importância pelos danos que pode causar em condições de baixa umidade do solo e alta temperatura. Não existem cultivares totalmente resistentes aos referidos patógenos, embora diferenças de suscetibilidade venham sendo constatadas. Variados métodos de inoculação em laboratório e casa de vegetação têm sido estudados visando a seleção de genótipos com resistência parcial, no entanto, a correlação com dados de severidade a campo é baixa. Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram a) estudar metodologias de inoculação de *S. sclerotiorum* em ambiente controlado quanto à eficiência, melhor época de inoculação e avaliação, condição de umidade após inoculação e correlação com dados de ensaios de campos naturalmente, b) verificar a variabilidade na agressividade de isolados provenientes de várias regiões do país; c) verificar a eficiência de metodologia de inoculação de *M. phaseolina* em sementes de soja e a correlação dos resultados com os obtidos em ensaio de campo. Os métodos estudados para *S. sclerotiorum* foram: punção da haste com palito colonizado, ferimento na haste, micélio sobre a axila das folhas, disco de micélio no solo, micélio sobre o pecíolo cortado, disco de micélio em ponteira sobre a haste cortada e, ainda, dois métodos envolvendo a utilização de solução de ácido oxálico: descoloração da haste e determinação do nível de pigmento solúvel. Foram inoculadas plantas em diferentes idades, mantidas sob três condições de umidade após inoculação. Para *M. phaseolina*, sementes de soja foram inoculadas por contato com colônias do fungo por 48h, e a germinação realizada em rolo de papel e em solo/areia. Dentre os métodos estudados para *S. sclerotiorum*, o do disco de micélio em ponteira sobre a haste cortada (42 DAS, na ausência de câmara úmida e avaliação aos 12 DAI) foi o mais indicado para seleção de genótipos de soja resistentes ao mofo-branco, por apresentar melhor repetibilidade e maior correlação com dados de severidade em ensaios de campo ($r_s = 0,383$). Os isolados de *S. sclerotiorum* variam em agressividade segundo o genótipo e o método de inoculação utilizados. Ambos os métodos de germinação de sementes inoculadas com *M. phaseolina* são eficientes para discriminação dos genótipos quanto à resistência a podridão-de-carvão, apontando alta correlação negativa ($r = -0,775$ e $-0,779$) com a severidade da doença observada em campo.

Palavras-chave: *Glycine max*. Metodologia de inoculação. *Macrophomina phaseolina*. Inoculação de sementes.

ISHIKAWA, Mayra Suemy. **Selection methodologies of soybean cultivars for resistance to white mold and charcoal rot and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates.** 2018. 105p. Thesis (Doctoral Degree in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Soybean white mold is a disease caused by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, and the charcoal rot is caused by the fungus *Macrophomina phaseolina*. Both pathogens are considered cosmopolitan and polyphagous, showing a wide range of hosts, among them, many cultivated species. These have as main characteristic the ability to form survival structures called sclerotia, which guarantee their survival in the soil for long periods, making control more difficult. *S. sclerotiorum* is an aggressive pathogen, which causes severe damage at conditions of high humidity and mild temperature; on the other hand, *M. phaseolina* is a natural inhabitant of the soil, which has been gaining importance due to damage that can cause under conditions of low soil humidity and high temperature. There are no cultivars totally resistant to these pathogens, although differences in susceptibility have been observed. Several methods of inoculation in the field, laboratory and greenhouse have been studied aiming the selection of genotypes with partial resistance; however, the correlation with field results is low. In this context, the objectives of this research were: a) to study inoculation methodologies for *S. sclerotiorum* under controlled environment in terms of efficiency, defining best inoculation and evaluation periods, humidity conditions after inoculation, and correlation with data from infested fields, b) to verify the variability in the aggressiveness of isolates from several regions of the country; and c) to verify the efficiency of a inoculation methodology of *M. phaseolina* in soybean seeds and assess the correlation of the results with data from field test. The methods studied for *S. sclerotiorum* were: puncture of the stem with colonized toothpick, wounded stem, mycelial on leaves axils, disc of mycelial in the soil, mycelium on cut-petiole, disc of mycelial on cut-stem and, two methods involving the use of oxalic acid solution: discoloration of the stem and determination of the level of soluble pigment. Plants at different ages were inoculated under three humidity conditions after inoculation. For *M. phaseolina*, soybean seeds were inoculated by contact with fungal colonies for 48h, and the germination was carried out in paper roll and in pots. The mycelial disc on cut stem method (42 DAS, in the absence of humid chamber and evaluation at 12 DAI) was the most adequate for selection of resistant soybean genotypes to sclerotinia stem rot, showing the highest repeatability and correlation with severity data from field trials ($r_s = 0.383$). The isolates of *S. sclerotiorum* vary in aggressiveness according to the genotype and inoculation method used. Both germination methods of seed inoculated with *M. phaseolina* are efficient to discriminate the genotypes for resistance to charcoal rot, showing high negative correlation ($r = - 0.775$ and $- 0.779$) with the disease severity observed in the field.

Keywords: *Glycine max.* Inoculation methodology. *Macrophomina phaseolina*. Seed inoculation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1–	Genótipos de soja utilizados nos experimentos de campo em Arapoti-PR e Papanduva – SC, nas safras 2014/2015 e 2015/2016.....	34
Tabela 3.2 –	Área abaixo da curva de progresso da severidade do mofo-branco normalizada (AACPDN) em genótipos de soja em ensaios de campo, em Papanduva-SC e Arapoti-PR nas safras 2014/2015 e 2015/2016.....	42
Tabela 3.3 –	Resumo da análise de variância conjunta de seis genótipos de soja para AACPDN da severidade de mofo-branco em ensaios de campo naturalmente infestados, em Papanduva-SC e Arapoti-Pr.....	44
Tabela 3.4 –	Área abaixo da curva de progresso da doença normalizada (AACPDN) da severidade de mofo-branco em ensaios de campo, em Papanduva-SC e Arapoti-PR, por análise conjunta, e nível de resistência das cultivares BMX Turbo RR, NS 5959 IPRO, BMX Apolo RR, TMG 7062, TMG 7161 e BMX Veloz RR.....	44
Tabela 3.5 –	Área abaixo da curva de progresso da doença normalizada (AACPDN) da incidência ou severidade de mofo-branco em plantas de soja inoculadas aos 10, 14, 21, 28, 35 e 42 dias após a semeadura (DAS), usando diferentes metodologias de inoculação: a- Método de punção da haste com palito colonizado, b- Método do fermento na haste, c- Método do micélio sobre axila das folhas, d- Método do disco de micélio no solo e e- Método do disco de micélio sobre o pecíolo cortado.....	45
Tabela 3.6 –	Valores da absorbância (518 nm) de soluções de ácido oxálico 40mM após incubação por 48 horas com hastes cortadas de plantas de soja de 17 dias de idade.....	48
Tabela 3.7 –	Coefficiente de correlação (rs) e p-valor de correlações de Spearman positivas e significativas entre dados de severidade de mofo-branco usando metodologias de inoculação de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em casa de vegetação (com diferentes condições de umidade após inoculação e épocas de avaliação), com dados de severidade em campos naturalmente infestados em Papanduva-SC (safras 2014/15, 2015/16 e 2016/17) e Arapoti-PR (safras 2014/15 e 2015/16).....	50

Tabela 4.1 – Genótipos de soja utilizados nos experimentos de campo em Arapoti-PR (safras 2014/2015 e 2015/2016) e Papanduva – SC (safras 2014/2015, 2015/2016 e 2016/2017).....	55
Tabela 4.2 – Área abaixo da curva de progresso normalizada da severidade do mofo-branco (AACPDN) em genótipos de soja em ensaios de campo em Papanduva-SC e Arapoti-PR nas safras 2014/2015, 2015/2016 e 2016/2017.	59
Tabela 4.3 – Plântulas mortas (% incidência) pelo método da punção da haste com palito colonizado, em cinco experimentos independentes, em casa de vegetação. Os números entre parênteses representam o ranking dos genótipos dentro de cada experimento sendo o menor valor correspondente ao material mais resistente.....	60
Tabela 4.4 – Comprimento das lesões (mm) na haste de plantas de soja inoculadas pelo método do disco de micélio em ponteira sobre a haste cortada, em cinco experimentos independentes, em casa de vegetação. Os números entre parênteses representam o ranking dos genótipos dentro de cada experimento sendo o menor valor correspondente ao material mais resistente.....	62
Tabela 4.5 – Comprimento (mm) da descoloração de hastes de plântulas de soja submetidas à solução de ácido oxálico 20 mM em cinco experimentos independentes. Os números entre parênteses representam o ranking dos genótipos dentro de cada experimento, sendo o menor valor correspondente ao material mais resistente.....	63
Tabela 4.6 – Coeficiente de correlação (rs) e p-valor de correlações de Spearman entre os dados de severidade em cada experimento independente de cada método de inoculação e resultados de severidade obtidos em ensaios realizados em condições de campo naturalmente infestados (Arapoti-PR safras 2014/15 e 2015/16; e Papanduva-SC safras 2014/15, 2015/16 e 2016/17).	64
Tabela 5.1 – Identificação e local de coleta de isolados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> obtidos a partir de plantas de soja com sintomas típicos de mofo-branco coletados em campos de cultivo no Brasil na safra 2014/2015.	69

Tabela 5.2 – Incidência (%) de morte de plântulas inoculadas com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> pelo método da punção da haste com palito colonizado, utilizando doze isolados do fungo e quatro cultivares de soja.....	72
Tabela 5.3 – Comprimento das lesões (cm) nas hastes de 18 genótipos de soja inoculadas com três isolados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> utilizando o método do disco de micélio em ponteira sobre a haste cortada.....	74
Tabela 6.1 – Incidência de podridão-de-carvão e nível de resistência/suscetibilidade de genótipos de soja em ensaio de campo realizado em Sertaneja-PR, safra 2015-2016.	82
Tabela 6.2 – Percentagem de germinação relativa em rolo de germinação (germinador) e em vasos (casa de vegetação) de sementes previamente inoculadas com <i>Macrophomina phaseolina</i>	85
Tabela 6.3 – Coeficiente de correlação (r) e p-valor de correlações de Pearson entre dados de percentagem de germinação relativa em rolo de papel ou em vasos em casa de vegetação de sementes infestadas com <i>Macrophomina phaseolina</i> com dados de severidade de podridão-de-carvão em ensaio de campo realizado em Sertaneja-PR.....	86

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	A CULTURA DA SOJA NO BRASIL	18
2.2	MOFO-BRANCO DA SOJA.....	19
2.2.1	Importância da Doença e Características do Patógeno	19
2.2.2	Ciclo da Doença e Epidemiologia.....	20
2.2.3	Manejo da Doença.....	22
2.2.4	Métodos de Inoculação de <i>Sclerotinia Sclerotiorum</i>	24
2.3	PODRIDÃO-DE-CARVÃO DA SOJA	26
2.3.1	Importância da Doença e Características do Patógeno	26
2.3.2	Ciclo da Doença e Epidemiologia.....	28
2.3.3	Manejo da Doença.....	29
2.3.4	Métodos de Inoculação de <i>Macrophomina Phaseolina</i>	30
3	ARTIGO A — METODOLOGIAS EM CASA DE VEGETAÇÃO PARA SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE SOJA RESISTENTES AO MOFO-BRANCO	32
3.1	RESUMO	32
3.2	ABSTRACT.....	32
3.3	INTRODUÇÃO.....	33
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.4.1	<i>Ensaio em campo</i>	35
3.4.2	<i>Ensaio em casa de vegetação</i>	36
3.4.2.1	<u>Ajustes de épocas de inoculação</u>	36
3.4.2.1.1	Método da punção da haste com palito colonizado	37
3.4.2.1.2	Método do ferimento na haste.....	38
3.4.2.1.3	Método do micélio sobre axila da folha	38
3.4.2.1.4	Método do micélio sobre pecíolo cortado.....	39
3.4.2.1.5	Método do disco de micélio no solo	39
3.4.2.1.6	Método de determinação do nível de pigmento solúvel em solução de ácido oxálico.....	39

3.4.2.2	<u>Ajustes de condições de umidade após a inoculação e época de avaliação</u>	40
3.4.2.2.1	Métodos da punção da haste com palito colonizado, fermento da haste e micélio sobre axila das folhas	40
3.4.2.2.2	Método do disco de micélio em ponteira sobre a haste cortada.....	41
3.4.2.2.3	Método da descoloração da haste em solução de ácido oxálico	41
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.5.1	<i>Ensaio de campo</i>	42
3.5.2	<i>Ensaio em casa de vegetação</i>	44
3.5.2.1	<u>Ajustes de épocas de inoculação e de avaliação</u>	44
3.5.2.2	<u>Ajustes de condições de umidade após a inoculação e época de avaliação</u>	50
3.6	CONCLUSÕES	52
4	ARTIGO B – REPRODUTIBILIDADE E CORRELAÇÃO COM DADOS DE CAMPO DE METODOLOGIAS DE INOCULAÇÃO DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> EM SOJA	53
4.1	RESUMO	53
4.2	ABSTRACT.....	53
4.3	INTRODUÇÃO.....	54
4.4	MATERIAL E MÉTODOS	55
4.4.1	<i>Ensaio de campo</i>	55
4.4.2	<i>Ensaio em casa de vegetação</i>	57
4.4.2.1	<u>Método da punção da haste com palito colonizado</u>	57
4.4.2.2	<u>Método do disco de micélio em ponteira sobre a haste cortada</u>	58
4.4.2.3	<u>Método da descoloração da haste em solução de ácido oxálico</u>	59
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.6	CONCLUSÕES	66
5	ARTIGO C – AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> EM GENÓTIPOS DE SOJA	67
5.1	RESUMO	67
5.2	ABSTRACT.....	67
5.3	INTRODUÇÃO.....	68

5.4	MATERIAL E MÉTODOS	69
5.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.6	CONCLUSÕES	77
6	ARTIGO D – INOCULAÇÃO DE <i>Macrophomina phaseolina</i> EM SEMENTES DE SOJA PARA SELEÇÃO DE GENÓTIPOS RESISTENTES À PODRIDÃO-DE-CARVÃO	78
6.1	RESUMO	78
6.2	ABSTRACT.....	78
6.3	INTRODUÇÃO.....	79
6.4	MATERIAL E MÉTODOS	81
6.4.1	<i>Ensaio de campo</i>	81
6.4.2	<i>Ensaios em casa de vegetação</i>	82
6.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
6.6	CONCLUSÕES	87
7	CONCLUSÕES GERAIS.....	88
	REFERÊNCIAS	89
	APÊNDICES	101
	APÊNDICE A – Correlações de Spearman entre incidência ou severidade de mofo-branco em plantas de soja inoculadas por diversos métodos em casa de vegetação, e resultados de severidade em condições de campo naturalmente infestados.....	102
	APÊNDICE B – Incidência de podridão-de-carvão em genótipos de soja, em ensaio de campo realizado em Sertaneja-PR, safra 2015-2016.....	105

1 INTRODUÇÃO

Dentre as mais de quarenta doenças relacionadas à cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merr.], treze ocorrem no sistema radicular, a partir de patógenos habitantes do solo. Os patógenos de solo atacam órgãos de reserva, raízes, caule, sistema vascular, ocasionando tombamento de plântulas, podridão de raízes, lesões escuras ou avermelhadas nas raízes e tem reflexo na parte aérea com amarelecimento de folhas, plantas com tamanho reduzido, desuniformidade no stand de plantas, morte em reboleiras, entre outras (BUENO; FISCHER, 2006). Destacam-se, dentro desse grupo *Sclerotinia sclerotiorum* (agente causal do mofo-branco ou podridão-branca-da-haste), *Macrophomina phaseolina* (agente causal da podridão-de-carvão) e *Rhizoctonia solani* (agente causal da morte-em-reboleiras) (GRIGOLLI, 2015).

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) De Bary é um importante fungo patogênico que infecta mais de 400 espécies diferentes de plantas em todo o mundo (BOLAND; HALL, 1994). Em soja, o fungo provoca o mofo-branco, uma importante doença que causa redução de rendimento. Os surtos de doenças causadas por *S. sclerotiorum* são altamente dependentes das condições ambientais favoráveis, que ocorrem quando clima úmido e temperaturas moderadas persistem durante e após a floração (GRAU; HARTMAN, 1999).

O controle do mofo-branco é considerado difícil devido à ausência de cultivares resistentes, à sobrevivência do fungo no solo e em sementes na forma de micélio dormente ou escleródios aderidos às mesmas, a ampla gama de hospedeiros, ao elevado número de ascósporos produzidos por apotécio e a sua rápida e longa disseminação a partir da fonte produtora. Embora vários trabalhos sobre resistência de genótipos de soja já tenham sido relatados na literatura, ainda pouco se sabe sobre fontes de resistência à *S. sclerotiorum*, bem como métodos práticos de seleção de germoplasma (GARCIA, 2008).

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid é também um importante fungo fitopatogênico, polífago, capaz de infectar mais de 500 espécies de plantas, incluindo culturas de importância econômica como soja, feijão, milho, algodão, girassol, amendoim e mamona (KHAN, 2007; NDIAYE, 2007; GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012). Em soja, a doença é conhecida por podridão-de-carvão, geralmente encontrada nas raízes e colo da planta. É a doença das raízes mais comum e amplamente disseminada, sendo o patógeno considerado um dos fungos mais prevalentes em infecções radiculares, no Brasil.

O fungo *M. phaseolina* causa significativas perdas na produção agrícola sob altas temperaturas, em condição de estresse hídrico (MUCHERO et al., 2011), e está amplamente distribuído em solos do mundo todo (SU et al., 2001).

O método mais prático e econômico para controlar a podridão causada por *M. phaseolina* seria através do uso de cultivares resistentes. No entanto, até o momento nenhum genótipo foi identificado com resistência a essa doença embora a ocorrência de tolerância tenha sido relatada por Mengistu et al. (2011; 2013) e Twizeyimana et al. (2012).

Encontrar novas fontes de resistência aos patógenos das plantas requer técnicas confiáveis de avaliação de doenças. Diferenças de susceptibilidade entre genótipos de soja vem sendo relatadas em ensaios de campo e de casa de vegetação para *S. sclerotiorum* (HOFFMAN et al., 2002) e *M. phaseolina* (SURRETTE; MEINTS; TREVATHAN, 2006; BRISTOW; WYLLIE, 1984).

A seleção para resistência em ensaios de campo é muitas vezes problemática, uma vez que os surtos da doença podem ocorrer de forma esporádica. Ainda que se procure uniformizar umidade e nível de inóculo no campo, os genótipos de soja variam em arquitetura, data de floração, e hospedabilidade, o que podem afetar o desenvolvimento da doença (MIKLAS; DELORME; RILEY, 2003; BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). A variabilidade entre os campos com diferentes características do solo e microflora que podem interagir com o patógeno ou entre locais e estações com diferentes padrões climáticos e umidade, podem produzir resultados inconsistentes entre os experimentos (WINKLER; HETRICK; TODD, 1994). Assim, avaliações em casa de vegetação e laboratório são muitas vezes executadas como parte integrante do método de seleção para resistência a doenças.

Embora diferenças de suscetibilidade entre materiais já tenham sido encontrados, e variadas técnicas de inoculação já foram descritas para seleção de resistência a *S. sclerotiorum*, muitas não apresentam praticidade e resultados consistentes, deixando a desejar, também, pela falta de repetibilidade dos resultados, pontos esses, essenciais a um programa de melhoramento massal, que visa selecionar genótipos com resistência a doenças.

Por se tratar de um patógeno transmitido via semente, estudos de metodologias de infestação de sementes com *M. phaseolina* para seleção de materiais resistentes foram estudados para culturas como o guandu (*Cajanus cajan*) (ROSA, 2006), mostrando-se um método eficiente de inoculação.

Neste contexto, o trabalho objetivou: 1) comparar metodologias de inoculação e avaliação de *S. sclerotiorum* em soja visando a seleção de genótipos resistentes, de maneira prática, repetível e que apresentem boa correlação com o comportamento dos materiais em campo; 2) analisar a variabilidade da agressividade de isolados de *S. sclerotiorum* provenientes de várias regiões do país; 3) verificar a eficiência da inoculação por

infestação de sementes de soja pela incubação em contato com colônias de *M. phaseolina*, avaliada pela germinação em dois ambientes (semeadura em papel de germinação ou em solo/areia em vasos) e correlaciona-la com a severidade da doença observada em ensaio de campo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DA SOJA NO BRASIL

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. Na safra 2016/17, o Brasil produziu cerca de 114,1 milhões de toneladas de soja numa área de quase 34 milhões de hectares, o que representa uma produtividade de 3.356 kg/ha. O país é ainda, o maior exportador mundial, com um volume atual de mais de 57 milhões de toneladas (CONAB, 2017).

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) pertence à família Fabaceae, é originária da Ásia, onde tem sido cultivada há centenas de anos (JULIATTI; POLIZEL; JULIATTI, 2004). Cultivada em várias regiões do Brasil, o cultivo da soja iniciou nos anos da década de 1940, no Rio Grande do Sul, e nas décadas de 1960 e 1970 foi introduzida no Centro-Oeste brasileiro, onde se consolidou, na década de 1990 (BLACK, 2000). Desde então, assumiu grande valor socioeconômico, devido à importância de seus produtos, tanto para o mercado interno quanto externo, além da geração de empregos nos diversos setores da economia. A soja é considerada o principal grão oleaginoso cultivado no mundo. Seu elevado teor de proteínas faz dela a principal matéria prima na fabricação de rações para alimentação animal e, apesar do seu baixo teor de óleo, está entre as maiores produtoras de óleo vegetal (DALL'AGNOL et al., 2007). No mundo, o Brasil é um dos poucos países com possibilidade de incremento nas áreas de plantio. Isso devido à disponibilidade de regiões aptas ao cultivo da soja, principalmente com expansão das Regiões Centro-Oeste e Norte (VINHOLES, 2014).

Apesar do grande volume produzido e consumido, seu potencial produtivo (4000 kg ha⁻¹) dificilmente é alcançado, e, entre os fatores que mais limitam o rendimento, a lucratividade e o sucesso de produção destacam-se a ocorrência de doenças (JULIATTI; POLIZEL; JULIATTI, 2004).

Segundo Sinclair e Beckman (1989), são listadas mais de 100 doenças afetando a cultura, sendo que 50 foram relatadas no Brasil. As perdas anuais de produção por doenças são estimadas em cerca de 15 a 20%, contudo, algumas podem ocasionar perda total da produção (EMBRAPA, 2003; JULIATTI et al., 2003; ALMEIDA et al., 2005).

2.2 MOFO-BRANCO DA SOJA

2.2.1 Importância da Doença e Características do Patógeno

Dentre as principais doenças que afetam a cultura da soja encontra-se o mofo-branco, também conhecido como podridão-de-esclerotínia ou podridão-branca-da-haste. Tem como agente causal o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, polífago, capaz de infectar ampla gama de hospedeiros. Dentre as culturas suscetíveis, destacam-se espécies economicamente importantes, como soja, feijão, tomate, algodão, alface, repolho, amendoim e girassol, e plantas daninhas, como carrapicho, picão, caruru, mentrasto e vassoura (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

A doença vem ganhando importância nos últimos anos, devido aos prejuízos causados e às dificuldades no seu manejo. Pode causar perdas de mais de 40% quando ocorrem condições favoráveis, como longos períodos de chuva e temperaturas amenas (PELTIER et al., 2012; HENNEBERG et al., 2012; JACCOUD FILHO et al., 2014). Perdas superiores a 50% foram relatadas por Cassetari Neto, Machado e Silva (2010). Na década de 80, Homechin (1982) determinou que as perdas da produção de soja devido a incidência de *S. sclerotiorum* em lavouras comerciais no Estado do Paraná, variaram de 70 a 92%. Lehner et al. (2017) realizaram uma meta-análise para avaliar a relação entre incidência de mofo-branco e produtividade de soja (35 ensaios em 14 locais ao longo de quatro safras), e concluíram que a cada 10% de aumento na incidência do fungo ocorre uma redução de na produtividade da ordem de 172 kg ha⁻¹. Ainda segundo o estudo, considerando um cenário de 43% de incidência em 22% da área plantada e de ausência de manejo adequado, o prejuízo causado por este fungo pode chegar a 1,47 bilhões de dólares americanos por ano no Brasil.

O mofo-branco da soja é considerado uma doença emergente, de grande importância econômica, especialmente em regiões que apresentam clima mais ameno, como nas condições encontradas nas regiões Sul, Sudeste e em áreas elevadas (acima de 700 metros de altitude) do Centro-Oeste e Nordeste, onde ocorrem temperaturas noturnas mais baixas (CASSETARI NETO; MACHADO; SILVA, 2010). Apesar da preferência por clima ameno e alta umidade do solo e ar, mesmo em regiões com temperaturas elevadas a doença pode ocorrer (CAMARGO, 2013). Os prejuízos diretos ocorrem em função da queda na produtividade da lavoura e, dentre as perdas indiretas, estão o aumento do custo de produção em função do emprego de métodos de controle e, o mais importante, a condenação de áreas para a produção de sementes (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

O fungo *S. sclerotiorum*, pertencente ao Filo Ascomycota, Classe Leotiomycetes, Ordem Helotiales e família Sclerotiniaceae. Este patógeno é cosmopolita e inespecífico, podendo infectar mais de 400 espécies de plantas (BOLAND; HALL, 1994).

O patógeno é um habitante do solo, necrotrófico e distribuído mundialmente, e tem por característica a produção de estruturas de resistência, chamadas escleródios, que podem permanecer viáveis no solo por um longo período, garantindo sua sobrevivência. A formação de escleródios é diretamente influenciada por fatores ambientais. Em geral, escleródios são produzidos após o micélio desenvolvido encontrar um ambiente de limitação nutricional (CHRISTIAS; LOCKWOOD, 1973). Os escleródios são estruturas formadas por hifas densamente entrelaçadas revestidas por uma camada negra de melanina, composto este importante para a proteção contra condições adversas e degradação microbial (HENSON; BUTLER; DAY, 1999).

Sclerotinia sclerotiorum ocorre em locais de clima ameno e úmido e ataca severamente quando as temperaturas variam de 15°C a 20°C (JONES et al., 1991), as quais são comuns em várias regiões do Brasil. A ocorrência de alta umidade do ar e água livre nas plantas por certo período favorece a germinação de estruturas de resistência do fungo presentes no solo, um importante fator para o ciclo da doença causada por *S. sclerotiorum* (HUNTER et al., 1984).

2.2.2 Ciclo da Doença e Epidemiologia

A sobrevivência de *S. sclerotiorum* ocorre na forma de micélio dormente em sementes, ou por escleródios presentes no solo ou que acompanham lotes de sementes (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

Os escleródios podem apresentar duas formas de germinação: miceliogênica, formando somente hifas; ou carpogênica, produzindo apotécios (ZIMMER; HOES, 1978). Estes são estruturas em forma de taça nos quais são formados os ascósporos, os quais são disseminados, principalmente, pelo vento (PAULA JÚNIOR et al., 2010). Sob temperatura na faixa de 10°C a 21°C e condições de alta umidade, escleródios germinam e desenvolvem os apotécios (ALMEIDA et al., 2005). Por isso, apotécios geralmente se formam após o fechamento das entrelinhas, pois o sombreamento auxilia na manutenção de níveis elevados de umidade no solo.

A disseminação do patógeno pode ocorrer a longas distâncias através das sementes de plantas hospedeiras misturadas a escleródios ou pela presença de micélio

dormente no endosperma. Pode ocorrer, ainda, disseminação de ascósporos e até mesmo pequenos escleródios pelo vento, ou aderidos ao solo em máquinas e implementos agrícolas, pela água da irrigação ou de chuvas (GORGEN, 2009).

Para germinação dos ascósporos e conseqüente infecção, é necessária presença de água livre e de uma fonte de nutrientes exógena, fornecida por tecidos senescentes e necróticos presentes no solo ou retidos nas hastes das plantas. Assim, o início do processo de infecção, geralmente, coincide com o período de fechamento do dossel da cultura e florescimento, quando flores senescentes servem como substrato para germinação dos ascósporos (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006; CANTERI; DALLA PRIA; SILVA, 1999).

Segundo Almeida et al. (2005), a fase mais vulnerável da cultura da soja vai do estágio da floração plena (R2) ao início da formação das vagens (R3/R4). O fungo é capaz de infectar qualquer parte da planta, porém, as infecções iniciam-se com maior frequência a partir das inflorescências e das axilas das folhas e dos ramos laterais. Os sintomas geralmente ocorrem no terço médio das plantas (LEITE, 2005).

O processo de infecção envolve a formação de apressórios, auxiliando na adesão do fungo através na cutícula da planta. Após a adesão ocorre a formação de uma vesícula na ponta do apressório, onde há várias enzimas de degradação. Na instalação do fungo em tecidos saudáveis, ocorre liberação local de ácido oxálico, substância que desempenha vários papéis importantes no crescimento dos fungos e seu metabolismo, principalmente atuando na colonização do tecido hospedeiro e subsequente degradação das células (DUTTON; EVANS, 1996). O ácido oxálico e as enzimas pectolíticas estão associados com o desenvolvimento da podridão-branca causada por *S. sclerotiorum*. O ácido oxálico penetra no tecido ao redor da lesão, fornecendo ótima condição para a ação das enzimas pectolíticas (MAXWELL; LUMSDEN, 1970).

Os primeiros sintomas são manchas de anasarca que evoluem para coloração castanho-clara (YORINORI, 1997). Sobre as áreas afetadas, ocorre abundante formação de micélio branco de aspecto cotonoso, que evolui para formação de inúmeros escleródios tanto na superfície, como no interior da haste e das vagens infectadas (ALMEIDA et al., 2005). O sintoma de mofo-branco é caracterizado pela degeneração da medula, em partes da planta ou da planta toda, impedindo o fluxo de água e nutrientes, ocasionando murcha e até levando a planta a morte (CASSETARI NETO; MACHADO; SILVA, 2010; GRAU, 1989).

Uma vez que a doença infecta o hospedeiro, pode espalhar-se para plantas adjacentes através do contato direto (PURDY, 1979; BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). Escleródios são formados no interior do tecido infectado mas a maior parte é formada na superfície dos tecidos, em condições de alta umidade. Nas vagens podem ser formados escleródios sobre a superfície externa ou na parte interna. Estes escleródios caem ao solo permanecendo por vários anos como fonte de inóculo primário para novos ciclos da doença (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

2.2.3 Manejo da Doença

O mofo-branco é uma doença de difícil controle, devido, principalmente, à formação de escleródios, aliado à possibilidade de os ascósporos responsáveis pela infecção aérea serem provenientes de escleródios existentes a longas distâncias e à alta suscetibilidade dos hospedeiros cultivados (GARCIA, 2008). Por isso, a principal medida de controle da doença consiste na prevenção, evitando a entrada do patógeno na área, pois, uma vez introduzido no local, é praticamente impossível erradicá-lo (ALMEIDA et al., 2005; PAULA JÚNIOR et al., 2010).

Em áreas afetadas, visando a redução das perdas provocadas pela doença, várias medidas de manejo integrado têm sido adotadas, como a limpeza de implementos agrícolas, a rotação de culturas com gramíneas, a integração lavoura-pecuária, o controle biológico e químico (FERRAZ et al, 2003; VIEIRA et al. 2001).

Com o objetivo de redução do inóculo inicial, recomenda-se o uso de sementes saudáveis e o tratamento de sementes com fungicidas. O tratamento de sementes com fungicidas consiste em tecnologia de baixo custo, pouco risco ambiental e, em geral, apresenta efeito significativo na produtividade (MENTEN et al., 2005). Além da aplicação em sementes, a pulverização de fungicidas tem sido o método mais usado no controle de *S. sclerotiorum* devido à falta de resistência genética em suas hospedeiras (BARDIN; HUANG, 2001).

Mueller et al. (2004) consideraram a utilização de fungicidas como uma estratégia eficaz de controle da doença, devido à flexibilidade do momento de aplicação, em comparação com outras medidas. No entanto, o sucesso do controle químico do mofo-branco está diretamente relacionado com a incidência e a severidade da doença, o fungicida e a época de aplicação, o número de aplicações, o volume de calda, o equipamento utilizado, o espaçamento, a densidade de semeadura e a cultivar (VIEIRA, 1994). A redução da incidência

da doença pelo uso de fungicidas apresenta variação entre 0 a 60%, não sendo possível controlar totalmente a doença (ESKER et al., 2011). Dessa forma, o controle químico não deve ser utilizado isoladamente, e sim como um dos componentes do manejo integrado do mofo-branco.

Métodos alternativos, tais como o controle biológico também foram estudados (HJELJORD; TROSMO, 2005) usando fungos, tais como *Trichoderma* sp., caracterizado como um micoparasita de *S. sclerotiorum*, capazes de colonizar micélio (ABDULLAH et al., 2008) e escleródios (HUANG; ERICKSON, 2008). Espécies do gênero *Trichoderma* apresentam-se como agentes de biocontrole, por diversas características, dentre as quais pode-se citar o rápido crescimento micelial, a alta produção de conídios, a síntese de substâncias antimicrobianas e a capacidade de sobreviver como saprófita, simbiote ou como micoparasita (ALVARENGA et al., 2007).

Apesar da ampla gama de hospedeiros suscetíveis a *S. sclerotiorum*, a rotação de culturas com espécies não hospedeiras, principalmente gramíneas, pode auxiliar na redução do inóculo na área, através da degradação natural dos escleródios por meio de antagonistas (LEITE, 2005). Porém, esta medida pode ser ineficaz para o controle do mofo-branco porque os escleródios sobrevivem no solo por vários anos na ausência de hospedeiro (VIEIRA, 1994).

Visando reduzir as condições favoráveis à ocorrência da doença, deve-se de priorizar o cultivo em locais bem drenados e ensolarados (PAULA JÚNIOR et al., 2010). O aumento do espaçamento entre plantas e a diminuição da densidade de plantas proporcionam maior aeração (ESKER et al., 2011; FURLAN, 2012; LEITE, 2005), evitando a formação de microclima favorável à doença, além de diminuir a possibilidade de contato entre plantas doentes com plantas saudáveis que estão nas proximidades (LEITE, 2005).

O sistema de plantio direto desfavorece a ocorrência da doença mofo-branco quando comparado ao plantio convencional. A presença da palhada, impede o contato da planta com o solo infestado, dificulta a formação de apotécios e dispersão de ascósporos, além de favorecer a ação de microrganismos antagonistas (PAULA JÚNIOR et al., 2010). No manejo convencional do solo, as operações de preparo do solo geralmente asseguram a presença de escleródios na superfície do solo ou próximo a ela (STEADMAN, 1983).

Por este patógeno apresentar uma alta agressividade, não existem cultivares de soja completamente resistentes ao mofo-branco, porém algumas podem apresentar resistência parcial (DORRANCE; MILLS, 2008; ESKER et al., 2011; FARIAS NETO et al., 2008). A utilização de variedades com resistência parcial é um dos mais efetivos métodos de

controle de mofo-branco da soja (KURLE et al., 2001). Genótipos com resistência parcial auxiliam consideravelmente no manejo dessa doença, reduzindo as perdas causadas por esse patógeno. A resistência parcial pode ser devida tanto à resistência fisiológica como a características da planta que propiciam condições menos favoráveis ao desenvolvimento do patógeno (mecanismos de escape). Os mecanismos de escape estão relacionados às características de acamamento, arquitetura do dossel, altura da planta, período de floração e maturação relativa (KIM; DIERS, 2000).

Yang, Lundeen e Uphoff (1999), afirmaram que, sob condições de campo, a incidência de *S. sclerotiorum*, em cultivares de soja relaciona-se aos grupos de maturação das mesmas, sendo que cultivares de ciclo longo apresentam maior incidência da doença do que cultivares de ciclo curto, fato provavelmente explicado pelo período de florescimento em cultivares de ciclo longo ser maior, período onde geralmente se têm bastante infecção, devido à liberação dos ascósporos.

2.2.4 Métodos de Inoculação de Sclerotinia Sclerotiorum

O objetivo dos programas de melhoramento de soja é a obtenção de cultivares com diferentes finalidades, principalmente relacionadas à alta produtividade e estabilidade em ambientes variados. A estabilidade pode ser conferida pela introdução de resistência à doenças, pragas e características especiais, como tolerância a diversos fatores que podem comprometer a produção (ALMEIDA; KIIHL, 1998).

No caso do mofo-branco da soja, o ideal seria analisar a suscetibilidade de genótipos sob condições naturais, mas a distribuição irregular de *S. sclerotiorum* em áreas de campo e a dependência de condições climáticas específicas (ALEXOPOULOS et al., 1996) torna a realização de ensaios no campo pouco confiável e altamente variável (SCHWARTZ; SINGH, 2013).

Além disso, mecanismos de escape e fatores ambientais que influenciam no desenvolvimento do patógeno, interferem diretamente no trabalho de avaliação da resistência fisiológica a campo o que dificulta o desenvolvimento de materiais resistentes ao mofo-branco (ARAHANA et al., 2001; VUONG et al., 2004).

Métodos de *screening* em ambiente controlado se fazem necessários para identificar cultivares de soja parcialmente resistentes à mofo-branco. No entanto, encontrar métodos de avaliação em casa de vegetação que determinem a resposta de cultivares de soja em campo tem sido difícil. Vários estudos têm sido realizados com este objetivo, pelas mais

variadas técnicas de inoculação do patógeno, seja na planta toda, em partes de plantas, com fermento ou não do tecido, ascósporos ou micélio (CLINE; JACOBSEN, 1983; CHUN; KAO; LOCKWOOD, 1987; KULL et al., 2003; WEGULO; YANG; MARTINSON, 1998; VUONG; HARTMAN, 2003; ROUSSEAU et al., 2004; KIM et al., 2000; JULIATTI et al., 2014; GARCIA et al., 2015; HÜLLER et al., 2016).

Uma vez que a colonização de *S. sclerotiorum* está associada a enzimas capazes de digerir e degradar a parede da célula do hospedeiro, vários autores têm associado a produção de ácido oxálico (OA) com a virulência (HAREL et al., 2006; KIM et al., 2008; WALZ et al., 2008; LIANG et al., 2015). Portanto, alguns ensaios de seleção de resistência têm se baseado nas respostas de diferentes genótipos ao ácido oxálico (GONÇALVES; SANTOS, 2010), um dos principais determinantes de virulência de *S. sclerotiorum*, usado para avaliar indiretamente os efeitos do fungo (WEGULO; YANG; MARTINSON, 1998).

Cline e Jacobsen (1983) estudaram três métodos de inoculação: inoculação com suspensão de ascósporos na parte aérea de plantas em floração plena; com pedaços de cenoura colonizados em trifólios de plantas em estágio V4-V5; e a inoculação por tempo determinado com pedaços de pecíolo de aipo colonizados em plantas também em estágio V4-V5. Os autores variaram as condições de umidade após inoculação das plantas, sendo que para alguns métodos as plantas foram mantidas em câmara de nebulização, e em outros, foram nebulizadas e colocadas em sacos plásticos. Como resultado, observaram que, em câmara de nebulização, a incidência da doença foi de 100%, e houve alta mortalidade das plantas, não sendo possível diferenciar os genótipos. Os mesmos destacaram o método da inoculação por tempo determinado utilizando-se pecíolo de aipo colonizado por 24 horas nas hastes das plantas, submetidas à nebulização e mantidas em sacos plásticos, como o método mais viável para a avaliação de resistência de soja à mofo-branco, pois os resultados de severidade da doença para os genótipos analisados corresponderam ao nível de infecção dos mesmos em campo.

Wegulo, Yang e Martinson (1998) compararam dados de campo natural e artificialmente infestados com métodos realizados em casa de vegetação. Os métodos por eles estudados foram o disco de micélio em folhas destacadas, com fermento; disco de cenoura colonizada na haste, com fermento; suspensão de micélio na parte aérea das plantas; e resposta ao ácido oxálico avaliado pelo comprimento da descoloração da haste e intensidade de pigmentação da solução. Todos os métodos foram eficientes em classificar genótipos de soja conforme sua suscetibilidade, no entanto, o autor destaca como desvantagem da suspensão de micélio, o maior tempo para aparecimento dos sintomas e avaliação, feita quatro

semanas após inoculação. A classificação dos genótipos variou entre os ensaios no campo e em casa de vegetação e os autores indicaram como confiáveis os métodos baseados na resposta das variedades ao ácido oxálico, por terem apresentado menor variabilidade de resultados entre repetições do experimento e maior correlação com os dados observados no campo, em comparação à inoculação com micélio na haste.

Resultados de reações pelo método do corte da haste apresentaram significativa correlação com os dados de campo em trabalhos de Vuong et al. (2004). O mesmo método mostrou melhores resultados em comparação com os métodos de folha destacada e inoculação dos cotilédones, quanto à resistência de soja e feijão a *S. sclerotiorum* (KULL et al., 2003).

Chun, Kao e Lockwood (1987) constataram grande variação nos valores de correlação ($r = -0,17$ a $0,63$) entre ensaios em laboratório e campo para incidência de da doença em genótipos de soja. Os autores destacaram a falta de reprodutibilidade dos resultados como um problema remanescente no estudo de metodologias para avaliação de resistência.

2.3 PODRIDÃO-DE-CARVÃO DA SOJA

2.3.1 Importância da Doença e Características do Patógeno

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid é um importante fungo fitopatogênico, polífago, capaz de infectar mais de 500 espécies de plantas, incluindo culturas de importância econômica como soja, feijão, milho, algodão, girassol, amendoim e mamona (KHAN, 2007; NDIAYE, 2007; GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012). Na maioria das culturas parasitadas por *M. phaseolina*, os sintomas vão desde podridão de sementes, passando pelo tombamento de mudas, podridão de raízes e podridões de caules até morte de plantas (SHORT; WYLLIE; AMMON, 1978).

Na soja, a doença é conhecida como podridão-de-carvão, geralmente encontrada nas raízes e colo da planta. É a doença das raízes mais comum e amplamente disseminada, sendo o patógeno considerado um dos fungos mais prevalentes em infecções radiculares, no Brasil.

O fungo *M. phaseolina* causa significativas perdas na produção agrícola sob altas temperaturas, em condição de estresse hídrico (MUCHERO et al., 2011), e está amplamente distribuído em solos do mundo todo (SU et al., 2001). Em regiões tropicais de

cultivo, a doença pode ocorrer ainda em fase de plântula, com perdas relatadas maiores que 70% (DHINGRA; MENDONÇA; MACEDO, 2009). Recentemente, tem ocorrido aumento mundial na incidência de relatos desse patógeno em diversas culturas, indicando a importância da doença para a produção agrícola em regiões propensas à seca (GAETÁN; FERNANDEZ; MADIA, 2006). Na região norte do Estado do Paraná, constatou-se que em anos secos, as cultivares de soja tardias apresentaram até 50% de perdas na produção (ALMEIDA et al., 2001).

O fungo pertence ao filo Ascomycota, família Botryosphaeriaceae, sendo caracterizado pela produção de picnídios e microescleródios nos tecidos dos hospedeiros (NDIAYE, 2007). O micélio do fungo é uninucleado com crescimento concêntrico de coloração acinzentada a preto com as hifas formando ramificações em ângulo reto (MACHADO; KIMATI, 1975).

Os microescleródios são estruturas duras e resistentes produzidas a partir do micélio do fungo, geralmente encontrados sob a epiderme das raízes e no colo das plantas infectadas, apresentando coloração marrom escura a preta, globulosos e lenticulares. Os picnídios e microescleródios são responsáveis pela sobrevivência do patógeno em condições adversas ou na ausência de hospedeiro suscetível sendo usualmente a fonte primária de inóculo, pois ficam no solo, nas sementes e em restos de cultura (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; VIANA, 1996; NDIAYE, 2007; GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012).

Os sintomas são lesões superficiais de coloração marrom avermelhada no colo da planta, raízes mais escuras e plantas com coloração amarelada, resultado da diminuição do fluxo de água e nutrientes. Folhas cloróticas, com o avanço da doença, tornam-se marrons, secam e permanecem aderidas ao pecíolo. Nessa fase, já é possível observar microescleródios nos tecidos infectados da planta (ALMEIDA et al., 2001). Os microescleródios formados nos tecidos vasculares e na medula deixam o caule com uma aparência acinzentada a escura, e a epiderme da raiz destaca-se facilmente (ALMEIDA et al., 2001). Os sintomas se evidenciam normalmente no final do ciclo da cultura e se confundem com o estágio de senescência das plantas. Por este motivo, a doença pode passar despercebida nas lavouras (ALMEIDA et al., 2001).

2.3.2 Ciclo da Doença e Epidemiologia

O fungo *M. phaseolina* sobrevive no solo como saprófita, parasitando hospedeiros alternativos ou sob a forma de microescleródios. A fonte de inóculo primário é

constituída pela semente infectada, pelo micélio do fungo colonizando restos de cultura e, principalmente, pelos microescleródios que germinam após a quebra da dormência infectando a base do caule das plântulas (DHINGRA; SINCLAIR, 1978).

Segundo Cloud e Rupe (1994) os microescleródios de *M. phaseolina* produzidos em tecidos de plantas são liberados ao solo com a decomposição dos resíduos da cultura, permanecendo viáveis por períodos entre 2 e 15 anos, dependendo das condições do ambiente ou se os escleródios estão ou não associados com os resíduos do hospedeiro.

Os exsudados do sistema radicular induzem a germinação dos microescleródios. A infecção das raízes do hospedeiro ocorre com a penetração do micélio na epiderme radicular ficando restrito aos espaços intercelulares do córtex das raízes primárias, podendo levar às plantas a morte por colapso das células. Durante o florescimento, hifas do fungo crescem intracelularmente através do xilema e formam microescleródios que bloqueiam os vasos causando colapso das células do hospedeiro (KHAN, 2007; KAUR et al. 2012). As plantas doentes apresentam lesões necróticas nas raízes, caule, ramos e pedúnculos por onde chegam até as vagens e invadem a semente que torna-se a principal fonte de disseminação na maioria das culturas afetadas. (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; NDIAYE, 2007).

Durante períodos de seca, onde a temperatura no solo se apresenta acima de 35 ° C durante 2 a 3 semanas e sua umidade é baixa, as plântulas podem ser infectadas e exibirem sintomas visíveis nos cotilédones. Os sintomas iniciais em plântulas apresentam coloração marrom e evoluem para manchas escuras. A partir do estágio de folha unifoliolada as lesões tornam-se castanho avermelhadas, circulares a oblongas em hipocótilos emergentes de plântulas infectadas, tornando-se marrom escuro a preto após vários dias. Estas lesões podem estender-se até a haste das plântulas infectadas que podem morrer se o período de seca persistir (GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012).

Os sintomas da doença em plantas adultas aparecem na parte aérea entre 1 e 4 semanas antes da maturação normal. Ocorre o amarelecimento das folhas que após secas ficam retidas na planta. O adiantamento da senescência forma reboleiras que são as manchas visíveis na lavoura com plantas doentes. As plantas sintomáticas que não morreram formam reboleiras ou faixas com folhas amareladas e posteriormente com ramos caídos com as folhas murchas presas às hastes (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; NDIAYE, 2007; ALMEIDA, 2001).

No ciclo da podridão-de-carvão, após morte da planta, a colonização dos tecidos do hospedeiro e a formação de microescleródios continuam, e com a decomposição dos restos vegetais são liberados no solo.

2.3.3 Manejo da Doença

Devido à infecção e desenvolvimento inicial das doenças ocorrerem abaixo do nível do solo, os patógenos radiculares geralmente são notados apenas quando atingem estados avançados. Desta forma as opções de controle tornam-se limitadas, pois ficam relativamente inacessíveis à manipulação direta do homem (WHEELER et al., 2001).

O método mais prático e econômico para controlar a podridão causada por *M. phaseolina* seria através do uso de cultivares resistentes. No entanto, existem hospedeiros nos quais ainda não foram identificadas fontes de resistência a esse patógeno. Na cultura da soja, onde o fungo causa enormes perdas, até o momento nenhum genótipo foi identificado com resistência a essa doença embora a ocorrência de tolerância tenha sido relatada por Mengistu et al. (2011; 2013) e Twizeyimana et al. (2012).

Em relação ao seu controle químico, no Brasil, não há fungicidas registrados para este patógeno na soja. Assim, as estratégias atuais disponíveis para o gerenciamento da podridão-de-carvão na soja envolvem principalmente o uso de métodos culturais que visam a redução do potencial de inóculo (DHINGRA; SINCLAIR, 1978). A rotação de culturas é uma medida de controle pouco adotada, já que o patógeno infecta um amplo espectro de hospedeiros.

Incidência reduzida da doença foi observada em campos de plantio direto onde a palha da safra de inverno deixada na superfície do solo contribuiu para diminuir a temperatura e aumentar a umidade (ALMEIDA et al., 2001). Por outro lado, a palhada de soja deixada sobre o solo no plantio direto se decompõe mais lentamente que quando enterrada podendo assim aumentar a permanência de agentes patogênicos necrotróficos e, conseqüentemente, aumentar as doenças de soja na próxima safra, fato observado por Almeida et al. (2001) em restos de cultura de soja mantidos sob ou sobre o solo, demonstrando que o fungo sobrevive e se multiplica saprofiticamente.

A solarização do solo (KATAN et al., 1976) vem sendo uma alternativa de controle para inúmeros patógenos veiculados pelo solo, por ser um método que não utiliza agroquímicos, não deixa resíduos e provoca baixo impacto no ambiente, além de ser um método simples e de fácil e segura aplicação. Kendig, Rupe e Scott (2000) também apresentam como alternativa para o controle de *M. phaseolina* a interferência na biologia e na

sobrevivência do patógeno, através de manejo do solo, promovendo ambiente inadequado para o desenvolvimento do mesmo, por meio da irrigação.

2.3.4 Métodos de Inoculação de *Macrophomina phaseolina*

Encontrar novas fontes de resistência aos patógenos das plantas requer técnicas confiáveis de avaliação da doença. A maioria dos estudos que avaliam o germoplasma de soja para resistência a *M. phaseolina* utilizam parcelas de campo, inoculadas com o fungo ou escolhidas pelo histórico da doença, no entanto, a variabilidade entre os campos com diferentes características do solo e microflora que podem interagir com *M. phaseolina* (WINKLER; HETRICK; TODD, 1994) ou entre locais e estações com diferentes padrões climáticos e umidade, podem produzir resultados inconsistentes a partir dos experimentos.

Os testes de campo que dependem da infestação natural estão sujeitos a uma precisão reduzida na detecção de diferenças verdadeiras entre os genótipos devido à falta de uniformidade da concentração e da distribuição de inóculo dentro e entre os campos (MIHAIL; ALCORN, 1987). Além disso, na maioria dos locais, apenas um único experimento de campo é concluído por safra agrícola. Tais limitações inerentes a experimentos de campo podem ter dificultado o progresso em direção à identificação de novas fontes de resistência à podridão-de-carvão em soja.

Testes em condições semicontroladas em casa de vegetação ou em condições controladas em câmaras de crescimento de plantas usando condições ambientais padronizadas e técnicas de inoculação podem complementar ou ajudar a superar as limitações de testes de campo.

Os genótipos de soja foram testados para resistência à podridão-de-carvão em ambientes controlado em casa de vegetação utilizando plantas de soja adultas (SURRETTE; MEINTS; TREVATHAN, 2006) e em câmaras de crescimento usando plântulas (BRISTOW; WYLLIE, 1984), no entanto, essa triagem não foi amplamente utilizada, possivelmente devido à falta de uma técnica de inoculação confiável.

Maringoni e Lauretti (1999) avaliaram a reação de genótipos de feijoeiro comum a *M. phaseolina* inoculando sementes pré-germinadas com suspensão de conídios e observaram que a maioria dos genótipos foram suscetíveis ao patógeno.

Rosa (2006) avaliou metodologias de inoculação para seleção de genótipos de guandu resistentes a *M. phaseolina*, por meio de sementes escarificadas ou não, submetidas

a diferentes períodos de exposição ao fungo, infestação do solo por sementes de sorgo colonizadas, e imersão das sementes em suspensão micelial. Somente o último método não foi considerado um método eficiente para inoculação das sementes.

Medeiros et al. (2015) estudaram a inoculação de *M. phaseolina* em meloeiro, pelos métodos do palito de dente colonizado e infestação do solo por substrato areno-orgânico colonizado, concluindo ser, o primeiro, mais eficiente para discriminar acessos de melão quanto a virulência do patógeno.

Claudino (2013), estudando *M. phaseolina* em mamona, testaram três métodos envolvendo o ferimento do caule, onde foram inseridos: disco de micélio, palito de dente colonizado ou grão de arroz colonizado, e o método de infestação do substrato de cultivo por incorporação de grãos de arroz colonizados, que, concluiu, ser o mais adequado para a avaliação da reação de genótipos de mamona a *M. phaseolina*.

3 ARTIGO A – METODOLOGIAS EM CASA DE VEGETAÇÃO PARA SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE SOJA RESISTENTES AO MOFO-BRANCO

3.1 RESUMO

Para seleção de genótipos de soja quanto à resistência a mofo-branco é necessário o estabelecimento de metodologias adequadas de inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* e de avaliação de severidade da doença. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar a eficiência, definindo a melhor época de inoculação de *S. sclerotiorum* e avaliação do mofo-branco bem como a condição de umidade após a inoculação, das seguintes metodologias: a) punção da haste com palito colonizado; b) ferimento na haste; c) micélio sobre a axila das folhas; d) micélio sobre o pecíolo cortado; e) disco de micélio no solo; f) determinação do nível de pigmento solúvel em solução de ácido oxálico; g) disco de micélio em ponteira sobre a haste cortada e h) descoloração da haste em solução de ácido oxálico. Seis cultivares comerciais de soja foram selecionadas para este experimento, de acordo com os seus comportamentos observados em ensaios de campo naturalmente infestados: BMX Veloz e TMG 7161 considerados resistentes; BMX Apolo e TMG 7062 considerados moderadamente resistentes; e BMX Turbo e NS 5959, suscetíveis. No primeiro experimento, as plantas foram inoculadas aos 10, 14, 21, 28, 35 e 42 dias após a semeadura, exceto para os métodos indiretos do ácido oxálico, realizados com plantas de 17 dias. No segundo experimento, variaram-se as condições de umidade após a inoculação e as avaliações da severidade realizadas em diferentes dias após inoculação (DAI) foram correlacionados com a severidade observada em ensaios de campo, em duas safras em Arapoti-PR e Papanduva-SC. A época de inoculação mais prática e capaz de distinguir os genótipos foi de 14 dias para punção da haste com palito colonizado e ferimento da haste, e 42 dias para micélio sobre axila da folha e disco de micélio em ponteira sobre a haste cortada. Correlações mais altas foram obtidas em ausência de câmara úmida, para avaliação da incidência aos 5 ou 6 DAI no método do palito ($r_s = 0,62$), para avaliação da severidade aos 12 DAI no método do disco de micélio em ponteira sobre a haste cortada ($r_s = 0,60$) e para descoloração na haste cortada em resposta ao ácido oxálico 20 mM, em plantas de 17 dias de idade ($r_s = 0,59$).

Palavras-chave: *Glycine max*. Métodos de inoculação. Mofo-branco da soja.

3.2 ABSTRACT

Screening of soybean genotypes for resistance to sclerotinia stem rot needs adequate methodologies for the inoculation of *Sclerotinia sclerotiorum* and the evaluation of the disease severity. Thus, the objective of this study was to verify the efficiency, defining the best period of *S. sclerotiorum* inoculation and disease evaluation as well as the most appropriate condition of humidity after inoculation, for the following methodologies: a) stem puncture with colonized toothpick; b) wounded stem; c) mycelium on the leaves axils; d) mycelium disc on the cut petiole; e) mycelium disc on the soil; f) determination of the level of soluble pigment in oxalic acid solution; g) mycelium disc on cut stem and h) stem discoloration by oxalic acid solution. Six commercial soybean cultivars were selected for this experiment, according to their performance in naturally infested field trials: BMX Veloz and TMG 7161 considered resistant; BMX Apollo and TMG 7062 moderately resistant; and BMX Turbo and NS 5959, susceptible. In the first experiment, plants were inoculated at 10, 14, 21, 28, 35 and 42 days after sowing, except for the oxalic acid indirect methods, which plants of

17 days of age were used. In the second experiment, the humidity conditions after inoculation were varied and the severity evaluation, conducted in varied dates after inoculation, were correlated with the severity observed in two field trials, at Arapoti-PR and Papanduva-SC. The more practical period of inoculation, able to distinguish the genotypes was 14 DAS for stem puncture with colonized toothpick and wounded stem, and 42 DAS for mycelium on the leaf axils and for mycelium disc on cut stem. Higher correlations were observed in the absence of humid chamber, evaluating the incidence at 5 or 6 DAI for the toothpick method ($r_s = 0.62$), evaluating the severity at 12 DAI for the mycelium disc on cut stem method ($r_s = 0.60$) and the stem discoloration in response to 20 mM oxalic acid solution, in 17 day old plants ($r_s = 0.59$).

Keywords: *Glycine max*. Inoculation methodologies. Soybean white mold.

3.3 INTRODUÇÃO

Os programas de melhoramento de soja visam a obtenção de alta produtividade e estabilidade em ambientes variados. A estabilidade pode ser conferida pela introdução de resistência a doenças, pragas e características especiais, como tolerância a diversos fatores que podem comprometer a produção (ALMEIDA; KIIHL, 1998).

Dentre as principais doenças que afetam a cultura da soja encontra-se o mofo-branco, também conhecida como podridão-de-esclerotínia ou podridão-branca-da-haste, doença causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. A doença vem ganhando importância nos últimos anos, devido aos prejuízos crescentes e às dificuldades no seu manejo. Importante mundialmente, esta doença pode causar perdas de mais de 40% quando ocorrem condições favoráveis, como longos períodos de chuva e temperaturas amenas (PELTIER et al., 2012; HENNEBERG et al., 2012; JACCOUD FILHO et al., 2014).

Por este patógeno apresentar uma alta agressividade, não existem cultivares de soja completamente resistentes ao mofo-branco, porém algumas podem apresentar resistência parcial (DORRANCE; MILLS, 2008; ESKER et al., 2011; FARIAS NETO et al., 2008). A utilização de variedades com resistência parcial é um dos mais efetivos métodos de controle de mofo-branco da soja (KURLE et al., 2001).

A realização de ensaios de campo seria o ideal para avaliar a resistência de genótipos de soja ao mofo-branco, mas a distribuição irregular do inóculo de *S. sclerotiorum* e a dependência de condições climáticas específicas (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996) torna esta metodologia pouco confiável e altamente variável (SCHWARTZ; SINGH, 2013). Os mecanismos de escape e os fatores ambientais que influenciam no desenvolvimento do patógeno interferem diretamente no trabalho de avaliação

da resistência fisiológica a campo o que dificulta o desenvolvimento de materiais resistentes ao mofo-branco (ARAHANA et al., 2001; VUONG et al., 2004).

Diferenças de susceptibilidade entre genótipos de soja a *S. sclerotiorum* foram relatadas em ensaios de campo e casa de vegetação (HOFFMAN et al., 2002). Ainda que se procure uniformizar umidade e nível de inóculo no campo, os genótipos de soja variam em arquitetura e data de floração, o que podem afetar o desenvolvimento da doença (MIKLAS; DELORME; RILEY, 2003; BOLTON; THOMMA.; NELSON, 2006). Assim, avaliações em casa de vegetação e laboratório são muitas vezes executadas para seleção de genótipos resistentes a *S. sclerotiorum* (KIM et al., 2000; VUONG et al., 2004).

No entanto, encontrar métodos de avaliação em casa de vegetação que se correlacionem com a resposta de cultivares de soja em campo tem sido difícil. Por isso, vários estudos têm sido realizados com este objetivo, pelas mais variadas técnicas de inoculação do patógeno, seja na planta toda, em partes de plantas, com ferimento ou não do tecido, usando ascósporos ou micélio (CLINE; JACOBSEN, 1983; CHUN; KAO; LOCKWOOD, 1987; KULL et al., 2003; WEGULO; YANG; MARTINSON, 1998; VUONG; HARTMAN, 2003; ROUSSEAU et al., 2004; KIM et al., 2000; JULIATTI et al., 2014; GARCIA et al., 2015; HÜLLER et al., 2016). Métodos indiretos de inoculação utilizando ácido oxálico também vêm sendo estudados, e apresentam como vantagens a independência da necessidade de manuseio do patógeno e dos erros advindos da variabilidade patogênica, além de evitar o efeito do ambiente na avaliação feita em condições de campo (LEITE, 2014).

Bons métodos de seleção, que consigam diferenciar pequenas variações nos níveis de resistência, são essenciais para se identificar níveis satisfatórios de resistência e, ao contrário de outros caracteres quantitativos, não só a planta e o meio ambiente, mas também o patógeno, influenciam a variabilidade fenotípica final (THOMÉ, 1999).

Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar metodologias para seleção de genótipos de soja quanto à resistência ao mofo-branco em casa de vegetação, quanto à melhor época de inoculação e avaliação, e correlacionar os dados de incidência ou severidade da doença em ambiente controlado com a severidade observada em ensaios de campo.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Ensaios em Campo

Experimentos de campo foram conduzidos nas safras 2014/15 e 2015/16, em dois locais, Arapoti - PR e Papanduva - SC, em áreas naturalmente infestadas com *S. sclerotiorum*.

Primeiramente foi feita avaliação de densidade de escleródios no solo das duas áreas, segundo metodologia adaptada de Görgen et al. (2009). Foram coletadas 12 amostras de solo de cada campo, seguindo-se um padrão de zigue-zague pela área total do ensaio. Para cada amostragem, uma moldura quadrada de 0,5 m de lado era posicionada sobre o solo, o qual foi coletado a uma profundidade de 5 cm. O solo foi acondicionado em sacos plásticos e levado ao laboratório, onde foi seco, destorroado e peneirado para quantificação dos escleródios, por meio de catação manual.

Os genótipos utilizados em cada safra e local são apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Genótipos de soja utilizados nos experimentos de campo em Arapoti-PR e Papanduva - SC, nas safras 2014/2015 e 2015/2016.

Arapoti		Papanduva	
Safra 14/15	Safra 15/16	Safra 14/15	Safra 15/16
NS 4823 RG	NS 4823 RG	NS 4823 RG	NS4823RG
BMX Veloz RR	BMX Veloz RR	BMX Veloz RR	BMX Veloz RR
DM 2362	DM 2362	DM 2362	DM 4301
DM 2333	DM 2333	DM 2333	DM2333
BMX Energia RR	BMX Energia RR	BMX Energia RR	BMX Energia RR
BMX Apolo RR	BMX Apolo RR	BMX Apolo RR	BMX Apolo RR
BMX Elite IPRO	BMX Elite IPRO	BMX Elite IPRO	BMX Elite IPRO
BMX Ativa RR	BMX Ativa RR	BMX Ativa RR	BMX Ativa RR
6458 RSF IPRO	6458 RSF IPRO	BMX Turbo RR	6458 RSF IPRO
BMX Turbo RR	BMX Turbo RR	BMX Alvo RR	BMX Turbo RR
BMX Alvo RR	BMX Alvo RR	NS 5959 IPRO	BMX Alvo RR
NS 5959 IPRO	NS 5959 IPRO	BMX Vanguarda IPRO	NS 5959 IPRO
BMX Vanguarda IPRO	BMX Vanguarda IPRO	A 5909 RG	BMX Vanguarda IPRO
A 5909 RG	A 5909 RG	M 5917 IPRO	A 5909 RG
M 5917 IPRO	M 5917 IPRO		M 5917IPRO
	TMG 7062		TMG 7062
	TMG 7161		TMG 7161
	BMX Lança IPRO		

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com três repetições. Cada parcela consistiu em oito linhas de soja espaçadas 0,5 metros e dez metros de comprimento (total de 40 m²).

A incidência e a severidade do mofo-branco foram avaliadas em cinquenta plantas da área central de cada parcela (excluindo as linhas externas e 1 metro de bordadura). Foi calculado o índice de severidade da doença com base nos sintomas observados, como descrito Sherwood e Hagedorn (1958). Os autores estabeleceram as seguintes classes de doença: 0 = ausência de sintomas; 1 = somente ramos laterais com presença de lesões; 2 = lesões na haste principal, mas pouco ou nenhum efeito sobre o enchimento das vagens; 3 = lesões na haste principal, resultando em morte da planta e incompleto enchimento das vagens. O índice de severidade da doença (ISD) pode variar de 0 a 100, e foi calculado para cada parcela pela seguinte fórmula:

$$ISD = \sum \frac{\text{classe} \times \text{n}^\circ \text{ de plantas na classe} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ total de plantas} \times 3}$$

A percentagem de incidência foi calculada pela relação do número de plantas que apresentaram nota diferente de zero e o número total de plantas avaliadas por parcela. A partir da incidência e dos índices de severidade, foram calculadas as áreas abaixo da curva de progresso da doença normalizada (AACPDN) segundo a fórmula $AACPDN = \{ \sum [((y_1+y_2)/2) \cdot (t_2 - t_1)] \} / t_t$, onde y_1 e y_2 são duas avaliações consecutivas realizadas nos tempos t_1 e t_2 , respectivamente, e t_t o tempo total de avaliação.

3.4.2 Ensaio em casa de vegetação

3.4.2.1 Ajustes de épocas de inoculação

Os ensaios foram realizados em laboratório e casa de vegetação na estação experimental da empresa GDM Seeds, localizada no município de Cambé-PR.

Os métodos de inoculação testados foram: método da punção da haste com palito colonizado; método do ferimento na haste; método do micélio sobre a axila das folhas; método do disco de micélio no solo; e método da determinação do nível de pigmento solúvel em solução de ácido oxálico. Foram realizadas as inoculações de cada método em plantas de

10, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de idade, exceto para o método do ácido oxálico, realizado em plantas de 17 dias de idade.

O isolado de *S. sclerotiorum* empregado nos testes foi obtido de escleródios provenientes de campo naturalmente infestado em Papanduva-SC. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições mais um controle não inoculado. Oito sementes foram semeadas por vaso, e no momento da inoculação, foram inoculadas cinco plantas, descartando-se as demais. As inoculações de todas as plantas foram realizada no mesmo dia, visando a uniformidade do inóculo e condições ambientais após a inoculação. Para tanto, foram realizadas semeaduras escalonadas de modo que, 10 dias após a última semeadura, houvessem plantas de todas as idades para serem inoculadas.

Para todos os ensaios utilizaram-se vasos de 0,75 L de capacidade preenchidos com mistura autoclavada de solo e areia na proporção 1:3 (v/v). Após a inoculação, as plantas foram nebulizadas, e os vasos mantidos em bandejas de aço com uma lâmina de água de aproximadamente 1 cm cobertos com plástico transparente.

3.4.2.1.1. Método da punção da haste com palito colonizado

Esse método baseou-se em metodologia descrita por Hildebrand (1953) com variações referidas por Tolêdo-Souza e Costa (2003). Para preparação do inóculo, pontas de palitos de dente com 1,5 cm de comprimento foram inseridas verticalmente em discos de papel de filtro com o mesmo diâmetro interno de uma placa de Petri. Placas contendo os palitos em papel, com a parte afilada voltada para cima, foram então autoclavadas a 121°C por trinta minutos. Sobre os palitos foi vertido meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), deixando exposto aproximadamente 2 mm da extremidade dos palitos. Após solidificação do meio, cinco discos de micélio de *S. sclerotiorum* foram distribuídos equidistantemente, e as placas incubadas a 20°C por cinco dias.

No momento da inoculação, os palitos totalmente cobertos por micélio, foram removidos das placas com auxílio de pinça esterilizada e inseridos na haste principal das plantas de soja, cerca de 2 cm abaixo dos cotilédones, para plantas de até 21 dias. Nas plantas mais velhas, houve muita dificuldade de inserção do palito devido à lenhosidade dos tecidos, portanto, a inoculação foi prejudicada e os dados descartados.. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com três repetições mais um controle não inoculado (punção da haste com palitos autoclavados). As avaliações foram feitas pela contagem das plantas mortas diariamente, com posterior cálculo da AACPDN para incidência.

3.4.2.1.2 Método do ferimento na haste

Este método foi baseado e adaptado da técnica de inoculação do hipocótilo (SCHMITTHENNER; BHAT, 1994). O fungo *S. sclerotiorum* foi cultivado em placas de Petri contendo meio BDA a 20°C por cinco dias. Após esse período, o micélio e o meio foram cortados em pedaços e homogeneizados. A agulha da seringa foi usada para fazer uma lesão de aproximadamente 1cm de comprimento na haste principal de plantas de soja, aproximadamente 2 cm abaixo dos cotilédones, e o inóculo foi inserido no ferimento aberto. Esse método também só foi possível de realizar em plantas de até 21 DAS, pois efetuar o ferimento com a agulha não foi possível em plantas mais velhas. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com três repetições mais o controle não inoculado, em que foi feito o ferimento com a agulha e deposição de meio de cultura BDA sem presença do fungo. A avaliação foi feita por contagem diária das plantas mortas, com posterior cálculo da AACPD para incidência.

3.4.2.1.3 Método do micélio sobre axila da folha

Esse método baseou-se no utilizado por Garcia et al. (2015), com modificações. Os autores inocularam discos de micélio em axila de trifólios e os fixaram com fita adesiva, porém, os autores destacaram o inconveniente da falta de aderência da fita adesiva em razão da umidade do tecido vegetal. Com o mesmo princípio e localização de inóculo, mas visando a praticidade da metodologia, foram realizadas modificações do método. O inóculo foi preparado conforme descrito em 3.4.2.1.2. Usando a seringa sem agulha, o inóculo foi depositado na axila da folha primária (em plantas de até 14 dias de idade que ainda não haviam emitido trifólio), ou do primeiro trifólio nas plantas a partir dessa idade. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com três repetições mais o controle não inoculado, em que foi depositado somente meio de cultura BDA. A avaliação foi feita pela contagem de plantas com morte do ponteiro, em plantas jovens, ou morte do trifólio, em plantas de 28 dias ou mais. As avaliações foram diárias, com posterior cálculo do progresso da doença pela AACPDN.

3.4.2.1.4 Método do micélio sobre pecíolo cortado

Este método foi realizado baseado em trabalho realizado por Hoffman et al. (2002), com adaptações. O fungo *S. sclerotiorum* foi cultivado em placas de petri contendo meio BDA a 20°C por cinco dias. Para a inoculação, a colônia foi virada dentro da placa, de modo que a superfície contendo micélio ficasse para baixo. O bocal de ponteiros de pipeta de 200µL foi inserido no meio de cultura nas margens da colônia do fungo, de modo a obter discos de micélio na região de ativo crescimento. A ponteira contendo o inóculo em seu interior, foi posicionada no pecíolo do primeiro trifólio, previamente cortado, com aproximadamente 2,5 cm de comprimento. Em plantas mais novas que ainda não haviam emitido trifólios, as ponteiros foram posicionadas no ponteiro cortado das plantas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições mais o controle não inoculado, em que ponteiros contendo somente discos de meio de cultura BDA foram utilizadas. A avaliação, pela contagem de plantas que apresentavam morte do ponteiro, foi realizada diariamente.

3.4.2.1.5 Método do disco de micélio no solo

O fungo *S. sclerotiorum* foi cultivado em placas de petri contendo meio BDA a 20°C por cinco dias. No momento da inoculação, discos de micélio foram retirados das bordas da colônia e depositados sobre o solo a 1 cm do colo de cada planta, com a superfície contendo o micélio voltada para baixo. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com três repetições mais o controle não inoculado, em que foram depositados somente discos de meio de cultura BDA. Este método não foi capaz de reproduzir sintomas da doença nas plantas.

3.4.2.1.6 Método de determinação do nível de pigmento solúvel em solução de ácido oxálico

Este método foi baseado em metodologia utilizada por Wegulo, Yang e Martinson (1998) que observaram a formação de pigmentação cor-de-rosa solúvel na solução de ácido oxálico à qual foram submetidas hastes cortadas de plantas de soja. Plantas de soja foram cultivadas em vasos de 0,75L de capacidade preenchidos com mistura autoclavada de solo e areia (1:3 v/v). Dezeset dias após a semeadura, as hastes das plantas foram cortadas com tesoura a 0,5 cm do solo, desfolhadas, e colocadas individualmente em tubos de ensaio

de 15 cm altura e 16 mm de diâmetro contendo 5 mL de ácido oxálico 40 mM. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com oito repetições mais duas testemunhas não inoculadas, que consistiram em tubetes contendo 5 mL de água destilada. Os tubos de ensaio foram mantidos em sala de crescimento a 20°C por 48 horas. As avaliações consistiram na medida da absorbância a 518 nm em espectrofotômetro (marca Micronal, modelo AJX-1600). O branco utilizado foi a solução de ácido oxálico 40 mM.

3.4.2.2 Ajustes de condições de umidade após a inoculação e época de avaliação

Baseados na experiência que tivemos com os ajustes de épocas de inoculação e levando em consideração a praticidade de execução dos métodos e as idades de planta, selecionou-se a melhor idade de planta para cada método, e, substituiu-se o método do micélio sobre o pecíolo cortado pelo método do disco de micélio em ponteira sobre a haste cortada. Incluiu-se, ainda, o método da resposta ao ácido oxálico pela avaliação da descoloração da haste.

Pela grande agressividade do fungo constatada nos ensaios realizados com câmara úmida constante, foi ajustada a condição de umidade após a inoculação, pelas seguintes variações: ausência de câmara úmida; 24 horas de câmara úmida, 72 horas de câmara úmida; e câmara úmida constante, exceto para o ensaio realizado com o ácido oxálico.

Os dados de severidade obtidos foram correlacionados com os resultados de severidade observados nos ensaios de campo das duas safras nos dois locais, pela análise de correlação de Spearman. Foram utilizados para correlação a incidência ou AACPDN ao final ou mesmo em intervalos menores de avaliação, para cada variação de câmara úmida após a inoculação.

3.4.2.2.1 Métodos da punção da haste com palito colonizado, ferimento da haste e micélio sobre axila das folhas

Os métodos da punção da haste com palito colonizado e do ferimento da haste foram realizados conforme descrito nos itens 3.4.2.1.1 e 3.4.2.1.2 respectivamente, somente para plantas com 14 dias de idade, utilizando-se vasos de capacidade 0,43 L. O método do micélio sobre axila das folhas foi repetido conforme item 3.4.2.1.3, para plantas com 42 dias de idade, em vasos de capacidade 0,75 L.

Para cada teste foram feitas três repetições por genótipo mais um controle

não inoculado. As avaliações de incidência foram realizadas em intervalos de um ou dois dias e a AACPDN foi calculada ao final das avaliações ou em períodos menores de avaliação.

3.4.2.2.2 Método do disco de micélio em ponteira sobre a haste cortada

Para este método, o preparo do inóculo e material utilizado foi o mesmo descrito no item 3.4.2.1.4. A diferença foi o local de inserção da ponteira contendo disco de micélio. Este teste foi realizado em plantas de 42 dias de idade, inoculando-se 6 plantas por vaso. A ponteira contendo o inóculo foi pressionada sobre a haste de cada planta previamente cortada com tesoura desinfestada, 2,5 cm acima do nó unifoliolar, baseando-se em metodologia descrita por Twizeyimana et al. (2012), para inoculação de *Macrophomina phaseolina* em soja.

Sete dias após a inoculação as ponteiras foram retiradas e iniciou-se a avaliação do comprimento das lesões causadas em cada haste, com o auxílio de uma régua milimetrada, até os 12 dias após inoculação. A partir da medida das lesões em cada avaliação, calculou-se a AACPDN.

3.4.2.2.3 Método da descoloração da haste em solução de ácido oxálico

Este é considerado um método indireto de inoculação, uma vez que, ao invés de trabalharmos com o fungo agente causal da doença, submetemos as plantas à toxina (ácido oxálico) produzida no processo de infecção, capaz de causar os sintomas. Este método foi baseado em metodologia utilizada por Wegulo, Yang e Martinson (1998).

Foram testadas plantas com 17, 30 e 45 dias de idade, submetidas a soluções de ácido oxálico em duas concentrações: 20 mM e 40 mM.

Em vasos plásticos de 1,3 L de capacidade contendo mistura de solo e areia (1:3 v/v) autoclavada, foram semeados os genótipos já citados. Dezesete dias após a semeadura, as plantas foram cortadas a 0,5 cm do solo, retirando-se as folhas primárias, e imediatamente colocadas em tubos de ensaio de 15 cm altura e 16 mm de diâmetro, contendo 10 mL de ácido oxálico 20 mM ou 40 mM. No controle, as plantas foram colocadas em tubetes contendo 10 mL de água destilada. Foram feitas 8 repetições por genótipo, e duas repetições do controle. Os tubos de ensaio, aleatoriamente organizados em grades, foram mantidos em sala de crescimento a 20° C e fotoperíodo 12h/12h. O mesmo processo foi repetido para plantas com 30 e 45 dias de idade. As avaliações consistiram na medição do descoloramento causado na haste, no quarto dia após serem colocadas no ácido, com o

auxílio de uma régua milimetrada.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 *Ensaio de campo*

O levantamento do número de escleródios no solo, realizado na primeira safra de estudo (2014/2015), resultou em um nível de 13 escleródios/m² no campo de Papanduva-SC, e 1,33 escleródios/m² no campo de Arapoti-PR. Apesar de que isso representa uma quantidade dez vezes maior de escleródios na área experimental de Papanduva, ocorreu epidemia da doença nos dois locais de estudo.

Gorgen (2009) encontrou número médio de escleródios na área experimental de 136,08 escleródios/m² de solo na camada de 0 a 5 cm de profundidade. Crato (2013) quantificou 7,1 escleródios/m² em área experimental antes da implantação da cultura. Adams e Ayers (1979) afirmaram que a presença de um único escleródio viável em 5 metros quadrados pode causar epidemia severa da doença.

A AACPDN da severidade da doença nos campos e safras são apresentados na Tabela 3.2. De maneira geral, pode-se dizer que, em Arapoti, ocorreu mais mofo-branco na primeira safra, diminuindo na segunda. Já em Papanduva, a epidemia foi menor na primeira safra, aumentando na segunda. Apesar do número de escleródios dez vezes menor em Arapoti, a doença ocorreu em maior nível. Além disso, a maior pressão de inóculo inicial no campo de Papanduva não permitiu uma discriminação de genótipos por severidade de mofo-branco como ocorreu em Arapoti na mesma safra. Este fato demonstra como a ocorrência da doença no campo é dependente de inúmeros fatores, principalmente relacionados ao ambiente.

Com exceção da primeira safra avaliada em Papanduva-SC, os genótipos puderam ser divididos em dois ou três grupos de acordo com o nível de suscetibilidade ao mofo-branco observado. No geral, a maioria dos genótipos apresentou comportamento consistente entre as safras e locais. BMX Turbo RR por exemplo, esteve sempre no grupo mais suscetível, enquanto BMX Veloz RR, no grupo mais resistente. Alguns materiais flutuaram substancialmente no *ranking* entre os ensaios, apresentando severidade atípica como BMX Alvo RR na primeira safra, em Arapoti-PR.

Tabela 3.2 – Área abaixo da curva de progresso da severidade do mofo-branco normalizada (AACPDN) em genótipos de soja em ensaios de campo, em Papanduva-SC e Arapoti-PR nas safras 2014/2015 e 2015/2016.

Genótipos	GM ¹	Papanduva-SC		Arapoti-PR	
		Safra 14/15	Safra 15/16	Safra 14/15	Safra 15/16
BMX Turbo RR	5.8	9,8 a*	15,2 a	32,6 a	9,7 a
DM 4301	5.1		16,5 a		
BMX Elite IPRO	5.5	12,6 a	14,2 a	20,6 a	16,1 a
NS 5959 IPRO	5.9	6,9 a	24,5 a	13,9 a	19,3 a
BMX Vanguarda IPRO	6.0	6,3 a	19,9 a	20,3 a	6,9 a
BMX Apolo RR	5.5	5,9 a	7,4 b	11,6 a	5,1 b
BMX Energia RR	5.3	2,3 a	1,6 b	3,3 b	0,6 b
TMG 7062	6.2		11,1 a		12,2 a
6458 RSF IPRO	5.8		4,6 b	5,4 b	2,6 b
TMG 7161	5.9		8,5 b		0,9 b
M 5917 IPRO	5.9	4,4 a	6,9 b	11,5 a	8,6 a
NS 4823 RG	4.8	3,1 a	9,8 b	0,3 c	2,4 b
A 5909 RG	6.0	7,6 a	8,4 b	7,3 a	4,9 b
DM 2333 RSF	5.2	3,5 a	7,6 b	0,03 c	1,9 b
BMX Ativa RR	5.6	6,8 a	9,8 b	5,03 b	6,0 a
BMX Veloz RR	5.0	2,9 a	3,0 b	0,3 c	2,6 b
BMX Alvo RR	5.9	9,5 a	6,9 b	13,4 a	1,6 b
DM 2362	5.0	0,9 a		0,0 c	0,5 b
BMX Lança IPRO	5.8				14,8 a
Média		5,9	10,3	9,7	6,0
CV (%)		47,2	30,7	47,3	44,6

¹Grupos de maturação

*letras iguais, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (para dados transformados por \sqrt{x}).

Um fator importante a ser considerado em ensaios de campo para doenças de plantas em geral, e, especialmente no caso do mofo-branco, é o grupo de maturação das cultivares utilizadas. Os grupos de maturação de soja variam de acordo com a latitude, sendo classificados por uma numeração de 0 a 10 e, no Brasil os grupos variam de 4,0 a 10. Quanto maior o seu número, mais longo é o ciclo e mais próximo ao Equador será sua região de adaptação. De forma geral, para cada aumento de número depois do ponto teremos de 1,5 a 2 dias a mais de ciclo (PENARIOL, 2000).

Variações na reação de cultivares de soja a *S. sclerotiorum* em condições de campo têm sido relacionadas a mecanismos de escape como arquitetura de planta, grupo de maturação e acamamento. Menor incidência da doença foi associada a cultivares de porte

baixo, mais precoces ou com pouco acamamento, em relação a cultivares altas, tardias e com maior índice de acamamento (BOLAND; HALL, 1987).

Cultivares de ciclo longo são mais suscetíveis, devido ao maior período de florescimento, o que aumenta a predisposição das plantas à infecção pelos ascósporos (YANG; LUNDEEN; UPHOFF, 1999). Aliado às condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da doença, os genótipos de grupos de maturação tardios podem expressar maior grau de suscetibilidade, ocasionando epidemias mais severas (VIDIC et al., 2013). Por outro lado, em cultivares de ciclos mais precoces pode ocorrer o escape da infecção das flores antes da liberação de ascósporos, reduzindo a doença em incidência e severidade, o que pode, em campo, segundo Nelson, Helms e Kural (1991), erroneamente classificar-se como resistência de cultivares.

No presente estudo, cultivares de ciclo mais precoce como NS 4823, BMX Veloz RR, DM 2333 RSF e DM 2362 estiveram sempre no grupo que apresentou menor severidade da doença. BMX Energia RR apresentou severidade baixa ou intermediária. A exceção foi DM 4301, que mostrou alta severidade da doença.

A respeito das cultivares de grupo de maturação acima de 5.3, a severidade da doença variou bastante. BMX Turbo RR, BMX Elite IPRO, NS 5959 IPRO e BMX Vanguarda IPRO comportaram-se como os mais suscetíveis apresentando consistência entre os locais e safras em que foram avaliados.

3.5.2 Ensaio em casa de vegetação

3.5.2.1 Ajustes de épocas de inoculação e de avaliação

Utilizaram-se seis cultivares comerciais de soja, selecionadas de acordo com seus desempenhos em ensaios prévios realizados em campos naturalmente infestados, pela análise conjunta das safras e locais. Os genótipos selecionados foram: BMX Veloz considerado mais resistentes; BMX Apolo, TMG 7062 e TMG 7161 considerados moderadamente resistentes; e BMX Turbo e NS 5959, suscetíveis. A análise de variância conjunta (Tabela 3.3) indicou efeito apenas de genótipo, ou seja, houve diferença entre os genótipos e o comportamento dos mesmos foi semelhante, nos ambientes estudados. As médias de AACPDN foram separadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e são apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.3 – Resumo da análise de variância conjunta de seis genótipos de soja para AACPDN da severidade de mofo-branco em ensaios de campo naturalmente infestados, em Papanduva-SC e Arapoti-PR.

Análise de variância conjunta					
Fontes de variação	G.L	SQ	QM	F	Pr(>F)
Ambiente (A)	2	48,4	24,2	1,4	02602
Genótipo (G)	5	1198,7	239,7	13,8	1,75 ⁻⁰⁷
Bloco dentro de Ambiente	6	102,7	17,1	1,0	04479
Interação A x G	5	184,5	36,9	2,1	00846
Resíduo	35	605,9	17,3		
Total	53	2140,2			

Tabela 3.4 – Área abaixo da curva de progresso da doença normalizada (AACPDN) da severidade de mofo-branco em ensaios de campo, em Papanduva-SC e Arapoti-PR, por análise conjunta, e nível de resistência das cultivares BMX Turbo RR, NS 5959 IPRO, BMX Apolo RR, TMG 7062, TMG 7161 e BMX Veloz RR.

Genótipo	AACPDN	Nível de resistência
NS 5959 IPRO	15,2 a*	S
BMX Turbo RR	14,3 a	S
TMG 7062	9,6 ab	MR
BMX Apolo RR	6,5 bc	MR
TMG 7161	4,7 bc	MR
BMX Veloz RR	2,6 c	R

* médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados da análise conjunta e a comparação das médias ratificam a variação esperada nos níveis de suscetibilidade dos genótipos selecionados.

As avaliações de incidência de mofo-branco usando diferentes metodologias de inoculação e idades de plantas são apresentados nas Tabelas 3.5 e 3.6.

Tabela 3.5 – Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPDN) da incidência ou severidade de mofo-branco em plantas de soja inoculadas aos 10, 14, 21, 28, 35 e 42 dias após a semeadura (DAS), usando diferentes metodologias de inoculação: a- Método de punção da haste com palito colonizado, b- Método do fermento na haste, c- Método do micélio sobre axila das folhas, d- Método do disco de micélio no solo e e- Método do disco de micélio sobre o pecíolo cortado.

a- Método da punção da haste com palito colonizado						
Genótipos	Idade das plantas quando inoculadas (DAS)					
	10	14	21	28	35	42
BMX Turbo RR	72,2 ¹	56,7 ¹	80,5 ²	—	—	—
NS 5959 IPRO	83,3	74,3	54,8	—	—	—
BMX Apolo RR	83,3	77,0	67,1	—	—	—
TMG 7062	72,2	48,3	57,6	—	—	—
BMX Veloz RR	58,3	52,7	54,8	—	—	—
TMG 7161	83,3	69,0	69,0	—	—	—
b- Método do fermento na haste						
Genótipos	Idade das plantas quando inoculadas (DAS)					
	10	14	21	28	35	42
BMX Turbo RR	62,8 ³	68,8 ⁴	75,2 ⁴	—	—	—
NS 5959 IPRO	60,8	63,3	90,2	—	—	—
BMX Apolo RR	84,2	56,1	87,1	—	—	—
TMG 7062	40,3	46,5	70,9	—	—	—
BMX Veloz RR	79,4	59,4	71,2	—	—	—
TMG 7161	78,6	36,1	73,5	—	—	—
c- Método do micélio sobre axila das folhas						
Genótipos	Idade das plantas quando inoculadas (DAS)					
	10	14	21	28	35	42
BMX Turbo RR	—	—	—	19,6 ⁵	6,9 ⁶	22,6 ⁶
NS 5959 IPRO	—	—	—	35,1	15,7	18,0
BMX Apolo RR	—	—	—	26,2	5,1	11,8
TMG 7062	—	—	—	16,7	46,6	13,9
BMX Veloz RR	—	—	—	18,9	0,0	10,4
TMG 7161	—	—	—	15,6	27,4	6,9
d- Método do disco de micélio no solo						
Genótipos	Idade das plantas quando inoculadas (DAS)					
	10	14	21	28	35	42
BMX Turbo RR	—	—	—	—	—	—
NS 5959 IPRO	—	—	—	—	—	—
BMX Apolo RR	—	—	—	—	—	—
TMG 7062	—	—	—	—	—	—
BMX Veloz RR	—	—	—	—	—	—
TMG 7161	—	—	—	—	—	—
e- Método do micélio sobre o pecíolo cortado						

Genótipos	Idade das plantas quando inoculadas (DAS)					
	10	14	21	28	35	42
BMX Turbo RR	—	—	82,1 ⁷	53,3 ⁸	41,9 ⁷	15,5 ⁷
NS 5959 IPRO	—	—	53,6	68,8	59,0	28,3
BMX Apolo RR	—	—	33,6	60,5	67,1	66,0
TMG 7062	—	—	76,7	55,6	29,05	19,0
BMX Veloz RR	—	—	82,1	36,7	28,8	41,7
TMG 7161	—	—	71,9	67,1	36,8	16,0

¹AACPDN da incidência aos 3 DAI; ²AACPDN da incidência aos 7 DAI; ³AACPDN da incidência aos 12 DAI; ⁴AACPDN da incidência aos 11 DAI; ⁵AACPDN da incidência aos 15 DAI; ⁶AACPDN da incidência aos 16 DAI; ⁷AACPDN da severidade aos 14 DAI; ⁸AACPDN da severidade aos 8 DAI.

Os métodos punção da haste com palito colonizado (Tabela 3.5a) e seringa com ferimento (Tabela 3.5b) foram viáveis de serem realizados em plantas de até 21 dias de idade. As hastes mais lignificadas das plantas mais velhas dificultaram a inserção do palito e o ferimento com a agulha da seringa. Plantas com 10 dias de idade foram bastante suscetíveis devido à alta agressividade do fungo. Definiu-se 14 dias como a melhor época para inoculação, para ambos os métodos, pois os resultados observados sugeriram menor incidência média da doença nos genótipos mais tolerantes. Tolêdo-Souza e Costa (2003) inocularam *S. sclerotiorum* pelo método do palito, hastes de plântulas de feijão aos onze dias após a emergência e observaram maior severidade da doença quando comparadas a plântulas da mesma idade inoculadas por disco de micélio na folha ou na axila da folha. No mesmo estudo, os autores salientam que o método do palito não foi capaz de discriminar os genótipos, o que também pode ser concluído no presente trabalho, pela alta incidência da doença em todos os genótipos testados.

A metodologia do micélio sobre axila das folhas (Tabela 3.5c) adaptou-se melhor para plantas com pelo menos 28 dias de idade. Nas plantas mais novas, a deposição do inóculo ocorre muito perto do ápice da planta, o qual morre facilmente. Resultados diferentes a este foram observados por Tolêdo-Souza e Costa (2003), em feijão, ao inocularem plântulas onze dias após a emergência com discos de micélio nas axilas foliares, e constataram que o método foi capaz de discriminar os genótipos, apresentando resultados similares às plantas inoculadas por suspensão de ascósporos, em plantas em estágio de floração, usadas para a validação dos testes.

O método do micélio sobre axila das folhas é análogo ao método de inoculação da haste sem ferimento, realizada por Hüller et al. (2016), em que discos de micélio foram fixados nas axilas do primeiro trifólio com auxílio de fita adesiva, porém em

plantas mais jovens (estádio V2). Os autores apontam o método como eficiente para distinguir genótipos de soja quanto à resistência ao mofo-branco. No presente trabalho, definiu-se 42 dias como a melhor idade de plantas para inoculação, uma vez que a incidência observada teve correspondência com a observada a campo,

O método do disco de micélio no solo (Tabela 3.5d) não foi eficiente para manifestação dos sintomas nas plantas. Somente duas plantas, de todas as inoculadas, apresentaram podridão e morreram. Em vista disto, o método foi descartado. Trabalhando com micélio seco depositado na superfície do solo, junto ao colo de plantas jovens, Chaves, Martinelli e Loch. (1996) obtiveram sucesso na inoculação, e concluíram que era um método eficiente para a seleção de genótipos de soja resistentes a *S. sclerotiorum*.

O método do micélio sobre pecíolo cortado (Tabela 3.5e) apresentou alguns problemas de execução. A inoculação e a avaliação foram consideradas pouco práticas, uma vez que, colocadas sobre os pecíolos, várias ponteiras caíram durante o manuseio das plantas. Além disso, o pecíolo infectado pelo patógeno, rapidamente era colonizado e se desprendia da haste, não provocando sintomas na mesma. No entanto, Garcia et al. (2015) apontaram o método da ponteira no pecíolo como eficiente, prático, reproduzível e de rápida execução para avaliação da resistência de soja ao mofo-branco.

Garcia e Juliatti (2012) trabalharam com o objetivo de determinar o estágio fenológico ideal de plantas de soja para inoculação de *S. sclerotiorum* pelo método do disco de micélio em folhas ou hastes utilizando duas cultivares e cinco estádios de desenvolvimento (V1, V2, V3, V4 e R1). Os autores consideraram o estágio V1 como o ideal para inoculação, devido à tenrura dos tecidos, o que facilita a infecção pelo patógeno e destacam uma redução na severidade da doença em plantas inoculadas em estágio R1, por estarem mais desenvolvidas e com tecidos mais lignificados. Realizando inoculação com discos de micélio em ferimento no terço médio das plantas, Juliatti et al. (2014) concluíram que o estágio final de florescimento e início de enchimento de grãos foi o que melhor apresentou resultados na avaliação da resistência de genótipos de soja ao mofo-branco.

Tabela 3.6 – Valores da absorvância (518 nm) de soluções de ácido oxálico 40mM após incubação por 48 horas com hastes cortadas de plantas de soja de 17 dias de idade.

Genótipo	Absorvância (518 nm)			Média
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	
BMX Turbo RR	0,0498	0,0703	0,0490	0,0548
NS 5959 IPRO	0,0470	0,0337	0,0227	0,0347
BMX Apolo RR	0,0080	0,0005	0,0005	0,0025
TMG 7062	0,0010	0,0003	0,0003	0,0006
TMG 7161	0,0000	0,0003	0,0010	0,0006
BMX Veloz RR	0,0483	0,0322	0,0202	0,0339

Quando realizado o primeiro experimento com o ácido oxálico para determinação no nível de pigmento róseo solúvel, observou-se que os menores valores de absorvância, ou seja, soluções menos pigmentadas, correspondiam àquelas incubadas com hastes de genótipos de hipocótipo verde (BMX Apolo RR, TMG 7062 e TMG 7161). Os demais genótipos, que apresentaram leituras superiores, ou seja, soluções mais pigmentadas, foram aqueles caracterizados por apresentarem hipocótipo roxo. Assim, acredita-se que a coloração rósea formada na solução é devido à presença de antocianina na planta.

A fim de confirmar essa observação, o experimento foi repetido mais duas vezes, e as informações comprovadas, portanto, este método não foi considerado adequado para seleção de germoplasmas de soja quanto à resistência ao mofo-branco, visto que, a resistência não parece estar relacionada com a presença de antocianina.

Após a clorofila, as antocianinas são o mais importante grupo de pigmentos de origem vegetal (HARBORNE; GRAYER, 1988). Compõem o maior grupo de pigmentos solúveis em água do reino vegetal e são encontradas em maior quantidade nas angiospermas (BRIDLE; TIMBERLAKE, 1997). As funções desempenhadas pelas antocianinas nas plantas são variadas: antioxidantes, proteção à ação da luz, mecanismo de defesa e função biológica. As cores vivas e intensas que elas produzem têm um papel importante em vários mecanismos reprodutores das plantas, tais como a polinização e a dispersão de sementes (LOPES et al., 2007).

Wegulo, Yang e Martinson (1998) avaliaram o mesmo método para seleção de genótipos de soja e destacaram a reprodutibilidade da metodologia. Observaram menores valores de absorvância, próximos de zero, para três genótipos, mas não notaram que os mesmos apresentam ausência de antocianina, caracterizado pela coloração verde do hipocótipo

e flores brancas. Os autores sugeriram que a pigmentação observada poderia estar envolvida com a resistência a *S. sclerotiorum*, geralmente numa relação inversamente proporcional, ou seja, quanto maior o nível de pigmentação, menor a incidência da doença no campo.

3.5.2.2 Ajustes de condições de umidade após a inoculação e época de avaliação

Nos estudos para ajuste da época de inoculação pelos diversos métodos empregados, observou-se grande agressividade do patógeno, principalmente para metodologias invasivas em plântulas novas, o que pode ter sido favorecido pela manutenção das plantas inoculadas em câmara úmida constante. Portanto, foram testadas diferentes condições de umidade após inoculação, objetivando o melhor ajuste das metodologias e o estudo da correlação dos resultados observados em casa de vegetação com os obtidos nos ensaios de campo.

Deste modo, foram realizados testes com os seis genótipos preestabelecidos, com plantas de 14 dias de idade para os métodos punção da haste com palito colonizado e ferimento na haste, e plantas de 42 dias de idade para os métodos micélio sobre axila das folhas e micélio sobre a haste cortada.

No caso do método da punção da haste com palito colonizado foram utilizados para a correlação com dados de campo os dados de incidência aos 2, 4, 5 e 6 DAI, e AACPDN aos 4, 5 e 6 DAI, para plantas não submetidas ou submetidas a 24 horas de câmara úmida; incidência aos 1, 2 e 4 DAI e AACPDN ao quarto dia para plantas submetidas a 72 horas ou câmara úmida constante.

Para o método do ferimento na haste, utilizaram-se os dados de incidência aos 2 e 4 DAI e AACPDN aos 4 DAI para 24 e 72 horas de câmara úmida, e incidência aos 1, 2 e 4 DAI e AACPDN aos 4 DAI para câmara úmida constante. No método do micélio sobre axila das folhas, a ausência ou 24 horas de câmara úmida não permitiu a manifestação dos sintomas da doença. Foram utilizados para correlação a incidência aos 8, 10, 12 e 14 DAI e AACPDN aos 12 e 14 DAI para câmara úmida constante e por 72 horas após inoculação.

No método do disco de micélio em ponteira sobre a haste cortada, correlacionaram-se os dados de severidade aos 7, 8, 10 e 12 DAI e AACPDN até os 8, 10 e 12 DAI para todas as condições de câmara úmida a que as plantas foram submetidas.

Para o método da resposta ao ácido oxálico foram correlacionados os dados de nível de descoloração da haste de plantas de 17, 30 e 45 dias de idade submetidas à solução de ácido oxálico 20mM e 40mM com os dados de AACPDN da severidade em campo.

As correlações de Spearman significativas e positivas entre os dados de severidade ou incidência dos diferentes métodos com os dados de campo, são apresentados na Tabela 3.6. Para o método da seringa sem ferimento, não houve ocorrência de correlações significativas positivas. Os demais métodos não apresentaram correlações significativas, ou quando significativas, foram negativas (ver Apêndice A), mostrando resultados divergentes dos observados para os mesmos materiais no campo. O valor das correlações positivas significativas variou de 45 a 62%.

Tabela 3.7 – Coeficiente de correlação (r_s) e p-valor de correlações de Spearman positivas e significativas entre dados de severidade de mofo-branco usando metodologias de inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* em casa de vegetação (com diferentes condições de umidade após inoculação e épocas de avaliação), com dados de severidade em campos naturalmente infestados em Papanduva-SC (safras 2014/15 e 2015/16) e Arapoti-PR (safras 2014/15 e 2015/16).

Correlação de Spearman		
Punção da haste com palito colonizado (14 DAS¹)		
	r_s	p-valor
Ausência de câmara úmida; incidência 4 DAI ²	0,506	0,023
Ausência de câmara úmida; incidência 5 DAI	0,620	0,004
Ausência de câmara úmida; incidência 6 DAI	0,620	0,004
Seringa com ferimento (14 DAS)		
	r_s	p-valor
Câmara úmida constante; incidência 1 DAI	0,447	0,048
Disco de micélio sobre haste cortada (42 DAS)		
	r_s	p-valor
Ausência de câmara úmida; severidade 12 DAI	0,602	0,005
Resposta ao ácido oxálico		
	r_s	p-valor
Plantas de 17 dias de idade, solução 20mM	0,590	0,006

¹ DAS = dias após a semeadura

² DAI = dias após a inoculação

Wegulo, Yang e Martinson (1998) estudaram respostas de cultivares de soja a *S. sclerotiorum*, em condições de campo e ambiente controlado. Os autores obtiveram valores de correlação de Pearson entre resultados do campo e casa de vegetação de 0,01 a 0,62 para inoculação em folhas destacadas; -0,20 a 0,47 para inoculação de discos de micélio na haste; 0,38 a 0,45 para incidência da doença em plantas inoculadas por suspensão de

micélio; 0,08 a 0,66 para comprimento da descoloração em hastes submetidas ao ácido oxálico; e -0,55 a -0,37 para o nível de pigmento solúvel das hastes. Resultados semelhantes no presente trabalho foram identificados para o método da descoloração em hastes por ácido oxálico ($r_s = 0,59$), único método em comum com o trabalho citado.

Andrade (2015) observou eficiência do método do palito colonizado para discriminar genótipos de soja em dois grupos conforme o nível de resistência à doença, porém, destacou que o método não apresentou correlação significativa com os dados obtidos em campo. Resultado distinto foi encontrado no presente trabalho, onde observamos correlação significativa e positiva para o mesmo método, quando avaliada incidência de morte de plântulas dos 4 aos 6 dias após a inoculação.

Ao avaliar a severidade de sintomas de plantas de soja de 20 dias de idade ocasionados pelo ácido oxálico a 10, 20 e 40 mM, Andrade (2015) concluiu que a concentração de 20 mM foi a mais adequada para testar as reações de cultivares por apresentar maior variação da média de notas entre a cultivar mais resistente e a mais suscetível, além dessas reações apresentarem correlação significativa de 0,50 com os resultados obtidos previamente em condições de campo. Esse resultado confirma o observado no presente trabalho, em que a severidade de plantas de 17 dias de idade submetidas à solução de ácido oxálico 20 mM corresponde-se melhor à severidade das cultivares em campo ($r_s = 0,59$, $p < 0,01$).

3.6 CONCLUSÕES

Os métodos de inoculação de *S. sclerotiorum*: punção da haste com palito colonizado, sem câmara úmida, em plantas de 14 dias de idade, avaliado pela incidência aos 5 dias após a inoculação; disco de micélio sobre haste cortada, sem câmara úmida, em plantas de 42 dias de idade, avaliado pela severidade aos 12 dias após a inoculação; e resposta ao ácido oxálico 20mM, em plantas de 17 dias de idade, avaliado pelo comprimento da descoloração da haste foram os mais eficientes e práticos para selecionar genótipos de soja resistentes ao mofo-branco, em casa de vegetação, embora não tenha sido considerada a reprodutibilidade dos mesmos.

4 ARTIGO B – REPRODUTIBILIDADE E CORRELAÇÃO COM DADOS DE CAMPO DE METODOLOGIAS DE INOCULAÇÃO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM SOJA

4.1 RESUMO

Para seleção de genótipos de soja resistentes ao mofo-branco é necessário o uso de metodologias de inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* que sejam eficientes, práticas e reprodutíveis. O objetivo deste trabalho foi estudar a reprodutibilidade e a correlação com dados obtidos em ensaios de campos naturalmente infestados de metodologias de inoculação previamente ajustadas para seleção de genótipos de soja resistentes ao mofo-branco em condições de ambiente controlado. Os ensaios de campo foram realizados em Arapoti-PR e Papanduva-SC. Os ensaios em casa de vegetação envolveram os seguintes métodos: a) punção da haste com palito colonizado em plantas de 14 dias de idade, ausência de câmara úmida após a inoculação e avaliação da incidência aos 5 DAI; b) disco de micélio em ponteira sobre a haste cortada em plantas de 42 dias de idade, ausência de câmara úmida após inoculação e avaliação do comprimento da lesão aos 12 DAI e c) descoloração da haste em solução de ácido oxálico – em plantas de 17 dias de idade em solução de ácido oxálico 20 mM. Cada metodologia foi repetida cinco vezes em experimentos independentes e os resultados correlacionados com a severidade observada nos ensaios de campo. A repetibilidade considerou o ranking de suscetibilidade dos genótipos em cada experimento. A incidência de mofo-branco pelo método da punção da haste com palito colonizado apresentou correlação significativa ($r_s = 0.43$) com a severidade observada nos ensaios de campo somente no primeiro experimento, e o ranking dos genótipos entre os experimentos não foi consistente. A descoloração da haste em resposta ao ácido oxálico correlacionou-se negativa e significativamente somente em um experimento ($r_s = - 0.30$). O disco de micélio em ponteira sobre a haste cortada apresentou correlação positiva significativa em três experimentos ($r_s = 0,365, 0,368$ e $0,383$), e maior consistência dos rankings dos genótipos, sendo indicado como o método de inoculação em casa de vegetação mais reprodutível e confiável para seleção de plantas para resistência ao mofo-branco em soja.

Palavras-chave: *Glycine max*. Metodologia de inoculação. Repetibilidade. Mofo-branco da soja.

4.2 ABSTRACT

Screening of soybean genotypes for resistance to sclerotinia stem rot requires the use of *Sclerotinia sclerotiorum* inoculation methodologies that are efficient, practical and reproducible. The objective of this work was to study the reproducibility and the correlation with data from naturally infested field trials of previously adjusted inoculation methodologies for screening of soybean genotypes for resistance to sclerotinia stem rot under controlled environment conditions. Field trials were performed in Arapoti-PR and Papanduva-SC. At greenhouse trials were tested the following methods: a) stem puncture with colonized toothpick in 14 days old plants, absence of humid chamber after inoculation and evaluation of incidence at 5 DAI; b) mycelium disc on cut stem in 42 days old plants, absence of humid chamber after inoculation and lesion length evaluation at 12 DAI and c) stem discoloration by 20mM oxalic acid solution in 17 days old plants. Each methodology was repeated five times in independent experiments and the results were correlated with the severity observed in field trials. The repeatability considered the susceptibility ranking of the soybean genotypes in each

experiment. The incidence of white mold by the stem puncture with colonized toothpick method showed a significant correlation ($r_s = 0.43$) with the severity observed in the field trials only in the first experiment, and the genotypes ranking among the experiments was not consistent. The stem discoloration in response to oxalic acid method correlated negatively and significantly only in one experiment ($r_s = -0.30$). The mycelial disc on cut stem showed a significant positive correlation in three experiments ($r_s = 0.366, 0.368$ and 0.383), and higher consistency in the genotypes ranking, being indicated as the most reproducible and reliable greenhouse inoculation method for resistant plants selection to sclerotinia stem rot in soybean.

Keywords: *Glycine max.* Inoculation methodology. Repeatability. Soybean white mold.

4.3 INTRODUÇÃO

O mofo-branco, podridão-branca-da-haste ou podridão-de-esclerotínia, causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é uma das doenças mais destrutivas da soja, principalmente em locais de alta umidade e temperaturas amenas (GRAU; HARTMAN, 1999). É uma doença de difícil controle, devido, principalmente, à formação de estruturas de resistência, denominadas escleródios, que garantem a sobrevivência do patógeno por longos períodos no solo, aliado à possibilidade de os ascósporos responsáveis pela infecção aérea serem provenientes de escleródios existentes a longas distâncias e à alta suscetibilidade dos hospedeiros cultivados (GARCIA, 2008).

Até o momento não há cultivares de soja com resistência genética ao mofo-branco, embora diferenças de suscetibilidade entre materiais já tenham sido relatadas. Portanto, as medidas de controle da doença incluem um manejo integrado afim de reduzir os danos causados pela doença. Por apresentar mais de 400 espécies de hospedeiros, muitas de importância agrícola como feijão, tomate, algodão, girassol e amendoim, a rotação de culturas fica comprometida (PAULA JUNIOR et al., 2006). O controle químico como medida isolada também não tem obtido sucesso, fazendo-se necessário o emprego de outros métodos conjuntamente para alcançar resultados satisfatórios que possibilitem manejar esta doença (REIS et al., 2011).

Os programas de melhoramento buscam métodos confiáveis para seleção de genótipos de soja quanto à resistência a *S. sclerotiorum*. Ainda que se procure uniformizar a umidade e nível de inóculo no campo, os genótipos de soja variam em arquitetura, data de floração, e hospedabilidade, o que pode afetar o desenvolvimento da doença (MIKLAS; DELORME; RILEY, 2003; BOLTON; THOMMA.; NELSON, 2006). Assim, avaliações em

casa de vegetação e laboratório são muitas realizadas para seleção de genótipos resistentes a *S. sclerotiorum* (KIM et al., 2000; VUONG et al., 2004).

No entanto, encontrar métodos de avaliação em casa de vegetação que se correlacionem com a resposta de cultivares de soja em campo tem sido difícil. Vários estudos têm sido realizados com este objetivo, pelas mais variadas técnicas de inoculação do patógeno, seja na planta toda, em partes de plantas, com fermento ou não do tecido, com ascósporos ou micélio (CLINE; JACOBSEN, 1983; CHUN; KAO; LOCKWOOD, 1987; KULL et al., 2003; WEGULO; YANG; MARTINSON, 1998; VUONG; HARTMAN, 2003; ROUSSEAU et al., 2004; KIM et al., 2000; JULIATTI et al., 2014; GARCIA et al., 2015; HÜLLER et al., 2016). Métodos indiretos de inoculação utilizando solução de ácido oxálico também têm sido estudados, e apresentam como vantagens a independência da necessidade de manuseio do patógeno e dos erros advindos da variabilidade patogênica, além de evitar o efeito do ambiente na avaliação feita em condições de campo (LEITE, 2014).

Embora diferenças de suscetibilidade entre materiais já tenham sido encontrados, e variadas técnicas de inoculação para seleção de resistência a *S. sclerotiorum* descritas, muitas não apresentam praticidade e reprodutibilidade dos resultados, pontos esses, essenciais a um programa de melhoramento massal, que visa selecionar genótipos com resistência a doenças.

Assim, este trabalho teve por objetivo estudar a reprodutibilidade e a correlação com dados obtidos em ensaios de campos naturalmente infestados de três metodologias de inoculação de *S. sclerotiorum* para seleção de genótipos de soja resistentes ao mofo-branco em casa de vegetação.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Ensaios em campo

Experimentos de campo foram conduzidos em Arapoti-PR (safras 2014/15 e 2015/16) e Papanduva-SC (safras 2014/15, 201/16 e 2016/17). Os genótipos utilizados em cada safra e local são apresentados na Tabela 4.1. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com três repetições. Cada parcela consistiu em oito linhas de soja espaçadas 0,5 metros e dez metros de comprimento (total de 40 m²).

Tabela 4.1 – Genótipos de soja utilizados nos experimentos de campo em Arapoti-PR (safras 2014/2015 e 2015/2016) e Papanduva – SC (safras 2014/2015, 2015/2016 e 2016/2017)

Arapoti - PR		Papanduva - SC		
Safra 14/15	Safra 15/16	Safra 14/15	Safra 15/16	Safra 16/17
NS 4823 RG	NS 4823 RG	NS 4823 RG	NS4823RG	NS 4823 RG
BMX Veloz RR	BMX Veloz RR	BMX Veloz RR	BMX Veloz RR	BMX Veloz RR
DM 2362	DM 2362	DM 2362	DM 4301	DM2362
DM 2333	DM 2333	DM 2333	DM2333	DM 4301
BMX Energia RR	BMX Energia RR	BMX Energia RR	BMX Energia RR	DM 2333
BMX Apolo RR	BMX Apolo RR	BMX Apolo RR	BMX Apolo RR	BMX Energia RR
BMX Elite IPRO	BMX Elite IPRO	BMX Elite IPRO	BMX Elite IPRO	BMX Apolo RR
BMX Ativa RR	BMX Ativa RR	BMX Ativa RR	BMX Ativa RR	BMX Elite IPRO
6458 RSF IPRO	6458 RSF IPRO	BMX Turbo RR	6458 RSF IPRO	BMX Ativa RR
BMX Turbo RR	BMX Turbo RR	BMX Alvo RR	BMX Turbo RR	6458 RSF IPRO
BMX Alvo RR	BMX Alvo RR	NS 5959 IPRO	BMX Alvo RR	BMX Turbo RR
NS 5959 IPRO	NS 5959 IPRO	BMX Vanguarda IPRO	NS 5959 IPRO	BMX Alvo RR
BMX Vanguarda IPRO	BMX Vanguarda IPRO	A 5909 RG	BMX Vanguarda IPRO	NS 5959 IPRO
A 5909 RG	A 5909 RG	M 5917 IPRO	A 5909 RG	BMX Vanguarda IPRO
M 5917 IPRO	M 5917 IPRO		M 5917IPRO	A 5909 RG
	TMG 7062		TMG 7062	M 5917 IPRO
	TMG 7161		TMG 7161	TMG 7062
	BMX Lança IPRO			TMG 7161

A incidência e a severidade do mofo-branco foram avaliadas em cinquenta plantas da área central de cada parcela (excluindo as linhas externas e 1 metro de bordadura). Foi calculado o índice de severidade da doença com base nos sintomas observados, como descrito Sherwood e Hagedorn (1958). Os autores estabeleceram as seguintes classes de doença: 0 = ausência de sintomas; 1 = somente ramos laterais com presença de lesões; 2 = lesões na haste principal, mas pouco ou nenhum efeito sobre o enchimento das vagens; 3 = lesões na haste principal, resultando em morte da planta e incompleto enchimento das vagens. O índice de severidade da doença (ISD) pode variar de 0 a 100, e foi calculado para cada parcela pela seguinte fórmula:

$$ISD = \sum \frac{classe \times n^{\circ} \text{ de plantas na classe} \times 100}{n^{\circ} \text{ total de plantas} \times 3}$$

A percentagem de incidência foi calculada pela relação do número de plantas que apresentaram nota diferente de zero e o número total de plantas avaliadas por parcela. A partir da incidência e do índice de severidade, foi calculada a AACPDN (área

abaixo da curva de progresso da doença normalizada) segundo a fórmula $AACPNDN = \{\Sigma[((y_1+y_2)/2)*(t_2-t_1)]\}/t_i$, onde y_1 e y_2 são duas avaliações consecutivas realizadas nos tempos t_1 e t_2 , respectivamente, e t_i o tempo total de avaliação. Os dados foram verificados quanto à homogeneidade e normalidade dos resíduos, e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4.4.2 Ensaio em casa de vegetação

Os ensaios foram realizados em laboratório e casa de vegetação da empresa GDM *seeds*, em Cambé-PR. Os métodos e avaliações realizadas em casa de vegetação que, previamente apresentaram maior correlação positiva significativa com os dados de ensaios de campo coletados, foram então estudados quanto à sua reprodutibilidade.

Assim os métodos de punção da haste com palito colonizado e disco de micélio em ponteira sobre a haste cortada (ambos sem utilização de câmara úmida) e o método da resposta ao ácido oxálico 20 mM em hastes de plantas de 17 dias de idade foram reproduzidos por cinco vezes, em 16 genótipos utilizados nos ensaios de campo.

Para determinar a repetibilidade, foram realizados cinco experimentos independentes de cada método como descrito abaixo. Os genótipos avaliados nos experimentos de repetibilidade de cada método foram ranqueados conforme o nível de suscetibilidade. Posteriormente os dados de cada experimento foram confrontados com os resultados de severidade obtidos pelos mesmos cultivares em condições de campo, pela correlação de Spearman.

4.4.2.1 Método da punção da haste com palito colonizado

Esse método baseou-se em metodologia descrita por Hildebrand (1953), com variações referidas por Tolêdo-Souza e Costa (2003). Os genótipos foram semeados em vasos de 0,75 L de capacidade preenchidos com mistura autoclavada de solo e areia na proporção 1:3 (v/v) e foram inoculados aos 14 dias de idade. Para o preparo do inóculo, pontas de palito de dente com 1,5 cm de comprimento foram inseridas verticalmente em discos de papel de filtro com o mesmo diâmetro interno de uma placa de Petri. Placas contendo os palitos em papel, com a parte afilada voltada para cima, foram então autoclavadas a 121° C por trinta minutos. Sobre os palitos foi vertido meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), deixando exposto aproximadamente 2 mm da extremidade dos palitos.

Após solidificação do meio, cinco discos de micélio de *S. sclerotiorum* foram distribuídos equidistantemente, e as placas incubadas a 20°C por cinco dias.

No momento da inoculação, os palitos totalmente cobertos por micélio, foram removidos das placas com auxílio de pinça esterilizada e inseridos na haste principal das plantas de soja, cerca de 2 cm abaixo dos cotilédones, em seis plantas por vaso. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com três repetições por genótipo, mais uma testemunha não inoculada, em que foram inseridos palitos limpos autoclavados. As plantas foram mantidas em sala climatizada a 20°C, fotoperíodo 12h/12h, sem realização de câmara úmida, com rega do solo quando necessário. A avaliação da incidência de plantas mortas foi realizada aos 5 dias após a inoculação (DAI).

4.4.2.2 Método do disco de micélio em ponteira sobre a haste cortada

Baseado na metodologia descrita por Twizeyimana et al. (2012) para inoculação de *Macrophomina phaseolina* em soja, este método foi realizado para plantas com 42 dias de idade, cultivadas em vasos de 1,3 L de capacidade contendo mistura de solo e areia (1:3 v/v) autoclavada.

O inóculo foi preparado repicando-se discos de micélio de colônias de *S. sclerotiorum* para placas de petri contendo meio de cultra BDA, e incubado a 20°C por cinco dias. Para a inoculação, o meio de cultura com o fungo crescido foi virado dentro da placa de petri, de modo que a superfície contendo micélio ficasse para baixo. Então, o bocal de ponteiras de pipeta (200µL) foram inseridas no meio de cultura, somente nas margens da colônia do fungo, de modo a obter discos de micélio na região de ativo crescimento. A ponteira contendo o inóculo foi pressionada sobre a haste de cada planta previamente cortada com tesoura desinfestada, 2,5 cm acima do nó unifoliolar. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. A unidade experimental foi constituída por seis plantas e foram realizadas três repetições por genótipo, mais uma testemunha não inoculada, em que foram inseridas sobre a haste cortada ponteiras contendo somente meio de cultura BDA.

As plantas foram mantidas em bancada de sala climatizada a 20°C, fotoperíodo de 12h/12h, sem câmara úmida, regando-se solo quando necessário. Aos sete DAI as ponteiras foram retiradas e aos 12 DAI foi realizada a medição do comprimento das lesões causadas em cada haste.

4.4.2.3 Método da descoloração da haste em solução de ácido oxálico

Este método foi baseado em metodologia utilizada por Wegulo, Yang e Martinson (1998). É considerado um método indireto de inoculação, uma vez que, ao invés de trabalhar-se com o fungo agente causal da doença, as plantas são submetidas à toxina produzida no processo de infecção, capaz de causar os sintomas.

Em vasos plásticos de 1,3 L de capacidade contendo mistura de solo e areia (1:3 v/v) autoclavada, foram semeados os genótipos de soja. Dezesete dias após a semeadura, as plantas foram cortadas a 0,5 cm do solo, retirando-se as folhas primárias, e as hastes imediatamente colocadas em tubos de ensaio (15 cm altura e 16 mm de diâmetro) contendo 10 mL de ácido oxálico 20 mM. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com seis repetições mais dois controles não inoculados, em que plantas foram colocadas em tubetes contendo 10 mL de água destilada.. Os tubos de ensaio, organizados em grades, foram mantidos em bancada de sala de climatizada a 20°C e fotoperíodo de 12h/12h. As avaliações consistiram na medição do comprimento do descoloramento causado na haste, no quarto dia de incubação no ácido oxálico.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A AACPDN da severidade da doença nos campos de Papanduva-SC e Arapoti-PR nas safras 2014/2015, 2015/2016 e 2016/2017 são apresentados na Tabela 4.2. Foi observada epidemia da doença nos dois locais e safras e, de maneira geral, pode-se dizer que, em Arapoti, ocorreu mais mofo-branco na primeira safra, diminuindo na segunda. Já em Papanduva, a epidemia foi menor na primeira safra, aumentando na segunda.

Com exceção da primeira safra avaliada em Papanduva-SC, os genótipos puderam ser divididos em dois ou três grupos de acordo com o nível de suscetibilidade ao mofo-branco observado. No geral, a maioria dos genótipos apresentou comportamento consistente entre as safras e locais. BMX Turbo RR por exemplo, esteve sempre no grupo mais suscetível, enquanto BMX Veloz RR, no grupo mais resistente. Alguns materiais flutuaram substancialmente no *ranking* entre os ensaios, apresentando severidade atípica como M 5917 IPRO nas duas safras em Arapoti-PR e BMX Alvo RR na primeira safra do mesmo local.

Tabela 4.2 – Área abaixo da curva de progresso normalizada da severidade do mofo-branco (AACPDN) em genótipos de soja em ensaios de campo em Papanduva-SC e Arapoti-PR nas safras 2014/2015, 2015/2016 e 2016/2017.

Genótipos	GM ¹	Papanduva - SC			Arapoti - PR	
		Safras			Safras	
		2014/2015	2015/2016	2016/2017	2014/2015	2015/2016
BMX Turbo RR	5.8	9,8 a*	15,2 a	18,1 a	32,6 a	9,7 a
DM 4301	5.1		16,5 a	16,9 a		
BMX Elite IPRO	5.5	12,6 a	14,2 a	11,05 b	20,65 a	16,1 a
NS 5959 IPRO	5.9	6,9 a	24,5 a	10,7 b	13,9 a	19,3 a
BMX Vanguarda IPRO	6.0	6,3 a	19,9 a	8,7 b	20,3 a	7,0 a
BMX Apolo RR	5.5	5,9 a	7,4 b	6,9 b	11,6 a	5,1 b
BMX Energia RR	5.3	2,3 a	1,65 b	6,2 b	3,3 b	0,6 b
TMG 7062	6.2		11,1 a	5,6 c		12,2 a
6458 RSF IPRO	5.8		4,6 b	5,5 c	5,4 b	2,65 b
TMG 7161	5.9		8,5 b	4,6 c		0,9 b
M 5917 IPRO	5.9	4,4 a	6,9 b	3,6 c	11,5 a	8,6 a
NS 4823 RG	4.8	3,1 a	9,8 b	3,5 c	0,35 c	2,4 b
A 5909 RG	6.0	7,6 a	8,4 b	3,4 c	7,3 a	4,9 b
DM 2333 RSF	5.2	3,5 a	7,6 b	2,8 c	0,03 c	1,9 b
BMX Ativa RR	5.6	6,85 a	9,8 b	2,2 c	5,03 b	6,0 a
BMX Veloz RR	5.0	2,95 a	3,0 b	2,1 c	0,3 c	2,6 b
BMX Alvo RR	5.9	9,5 a	6,95 b	1,6 c	13,4 a	1,6 b
DM2362	5.0	0,96 a		0,04 c	0,0 c	0,5 b
BMX Lança IPRO	5.8					14,85 a
Média		5,91	10,35	6,30	9,70	6,01
CV (%)		47,2	30,68	34,22	47,31	44,64

¹Grupos de maturação

*letras iguais, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (para dados transformados por \sqrt{x}).

Os resultados de morte de plântulas (incidência) inoculadas com *S. sclerotiorum* pelo método da punção da haste com palito colonizado são apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Plântulas mortas (% incidência) pelo método da punção da haste com palito colonizado, em cinco experimentos independentes, em casa de vegetação. Os números entre parênteses representam o ranking dos genótipos dentro de cada experimento sendo o menor valor correspondente ao material mais resistente.

Genótipos	Incidência (%) de morte de plântulas				
	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5
BMX Apolo RR	66,7 (16)	27,8 (6)	30,0 (11)	0 (1)	33,3 (11)
BMX Turbo RR	55,6 (15)	55,5 (16)	16,7 (5)	22,2 (10)	11,1 (2)
NS 5959 IPRO	47,8 (14)	38,9 (14)	50,0 (14)	22,2 (8)	33,3 (12)
BMX Vanguarda IPRO	38,9 (13)	11,1 (1)	22,2 (7)	22,2 (7)	16,7 (4)
M 5917 IPRO	38,9 (12)	27,8 (8)	27,8 (10)	50,0 (15)	16,7 (5)
DM 4301	33,3 (11)	22,2 (3)	33,3 (12)	22,2 (6)	33,3 (9)
TMG 7062	33,3 (10)	38,9 (13)	5,6 (1)	61,1 (16)	38,9 (14)
BMX Ativa RR	27,8 (9)	22,2 (2)	61,1 (15)	16,7 (3)	50,0 (16)
6458 RSF IPRO	27,8 (8)	27,8 (9)	72,2 (16)	33,3 (12)	33,3 (10)
BMX Elite IPRO	22,2 (7)	22,2 (5)	22,2 (8)	33,3 (13)	27,8 (8)
TMG 7161	22,2 (6)	33,3 (11)	15,9 (4)	16,7 (2)	16,7 (3)
BMX Veloz RR	18,9 (5)	33,3 (10)	27,8 (9)	38,9 (14)	44,4 (15)
BMX Energia RR	16,7 (4)	22,2 (4)	11,1 (3)	16,7 (4)	11,1 (1)
NS 4823 RG	16,7 (3)	27,8 (7)	38,9 (13)	22,2 (5)	27,8 (6)
A 5909 RG	11,1 (2)	44,4 (15)	18,9 (6)	27,8 (11)	27,8 (7)
BMX Alvo RR	5,6 (1)	35,6 (12)	5,6 (2)	22,2 (9)	33,3 (13)

Analisando os dados e as correlações dos experimentos independentes com os resultados de severidade obtidos nos ensaios realizados em condições de campo (Tabela 4.6), observamos que o método da punção da haste apresenta baixa repetibilidade e confiabilidade. Das cinco repetições do experimento, somente a primeira apresentou correlação significativa positiva ($r_s = 0,43$, $p < 0,01$) com os resultados de campo e, o *ranking* dos genótipos dos experimentos independentes não mostra consistência. Materiais altamente suscetíveis como BMX Turbo RR, BMX Apolo RR, NS 5959 IPRO e BMX Vanguarda IPRO chegaram a serem classificados como os mais resistentes, ocupando as primeiras posições nos experimentos 2, 4 e 5.

Os genótipos mais resistentes, no entanto, apresentam resultados mais constantes entre as repetições do experimento. TMG 7161, BMX Veloz RR, BMX Energia RR, NS 4823 RG, A 5909 RG e BMX Alvo RR figuraram sempre entre os menores valores de ranking, com algumas exceções, como o comportamento de NS 4823 no experimento 3 e A 5909 no experimento 2. Os genótipos de comportamento moderadamente resistente também

flutuaram bastante entre os *rankings* dos experimentos. Assim, a aplicação deste método na seleção de materiais resistentes não é confiável.

Resultados semelhantes foram obtidos por Tolêdo-Souza e Costa (2003) ao inocular hastes de plântulas de soja com palito colonizado e relataram esse método como sendo de baixa reprodutibilidade, apresentando um alto coeficiente de variação, indicando a necessidade de um grande número de repetições para maior confiabilidade.

Com relação ao método do disco de micélio em ponteira sobre a haste cortada, observamos correlação significativa ($p < 0,01$) com os dados de campo para os experimentos 2 ($r_s = 0,37$), 4 ($r_s = 0,36$) e 5 ($r_s = 0,38$) (Tabela 4.6). Vuong et al. (2004) também compararam dados de severidade de mofo-branco obtidos com diferentes metodologias de inoculação com dados de ensaios em condições de campo e destacaram forte correlação entre resultados do campo e método de inoculação do corte da haste e deposição de disco de micélio, tanto para soja, feijão e girassol.

Analisando o *ranking* dos genótipos em cada experimento (Tabela 4.4), observamos novamente que BMX Vanguarda IPRO, BMX Turbo RR, NS 5959 RG figuram entre as cultivares mais suscetíveis como observado no campo. Convém destacar aqui, a eficiência do método em apontar a DM 4301 como suscetível, o que foi observado em condições de campo quando foi testada esta cultivar. Por outro lado, NS 4823 RG, caracterizada por apresentar bom nível de resistência no campo e no método da punção da haste com palito colonizado, quando avaliada pelo presente método, revelou alta suscetibilidade.

O fato de cultivares apresentarem comportamentos divergentes em condições de campo naturalmente infestado e inoculação em ambiente controlado pode ser explicada por mecanismos de escape altamente relacionados ao ciclo e grupo de maturação a que pertencem. No caso, NS 4823 é um material superprecoce, o que, em condições de campo, colabora para a menor incidência e severidade da doença, uma vez que apresenta menor tempo de floração, menor período crítico à infecção e, portanto, menor desenvolvimento da doença.

Em relação ao comportamento das cultivares mais resistentes, TMG 7062, TMG 7161, BMX Ativa RR e BMX Veloz RR (com exceção da repetição 2), apresentou-se consistente entre os experimentos. Assim, o método é considerado o mais adequado para triagem de genótipos resistentes a *S. sclerotiorum*, por apresentar maior número de experimentos significativos e positivamente correlacionados com dados de campo e maior correspondência do *ranking* de suscetibilidade dentro dos experimentos independentes. Em

programas de melhoramento que buscam resistência genética ao mofo-branco, genótipos que apresentam mecanismos de escape, não são tão interessantes, portanto, podem ser descartados quando apresentam-se altamente suscetíveis em condições de inoculação em ambiente controlado, sem perda para o programa de melhoramento.

Tabela 4.4 – Comprimento das lesões (mm) na haste de plantas de soja inoculadas pelo método do disco de micélio em ponteira sobre a haste cortada, em cinco experimentos independentes, em casa de vegetação. Os números entre parênteses representam o ranking dos genótipos dentro de cada experimento sendo o menor valor correspondente ao material mais resistente.

Genótipos	Comprimento da lesão na haste (mm)				
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5
DM 4301	145,7 (16)	95,8 (14)	178,6 (16)	157,0 (11)	172,9 (11)
NS 4823 RG	124,8 (15)	95,3 (13)	177,0 (15)	154,8 (8)	180,6 (16)
BMX Energia RR	119,6 (14)	79,9 (7)	167,0 (11)	156,2 (9)	167,2 (8)
BMX Turbo RR	112,6 (13)	90,0 (10)	164,0 (8)	161,3 (13)	177,5 (15)
6458 RSF IPRO	111,0 (12)	72,1 (6)	164,2 (9)	136,7 (3)	121,3 (2)
NS 5959 IPRO	110,8 (11)	92,9 (12)	150,9 (4)	160,1 (12)	175,9 (14)
BMX Vanguarda IPRO	110,7 (10)	98,9 (15)	175,8 (14)	166,9 (15)	175,3 (13)
BMX Elite IPRO	109,2 (9)	99,0 (16)	166,5 (10)	151,8 (7)	169,6 (9)
BMX Apolo RR	106,2 (8)	55,2 (4)	171,9 (13)	156,3 (10)	175,2 (12)
BMX Ativa RR	98,8 (7)	48,8 (3)	155,7 (5)	129,2 (1)	150,9 (5)
BMX Alvo RR	97,1 (6)	81,5 (8)	167,3 (12)	163,7 (14)	163,3 (7)
BMX Veloz RR	91,0 (5)	87,4 (9)	130,8 (2)	141,9 (4)	145,2 (4)
A 5909 RG	86,1 (4)	90,3 (11)	162,8 (7)	167,6 (16)	171,1 (10)
M 5917 IPRO	82,7 (3)	67,0 (5)	159,2 (6)	148,0 (6)	158,2 (6)
TMG 7062	76,1 (2)	48,7 (2)	133,5 (3)	147,3 (5)	128,6 (3)
TMG 7161	52,8 (1)	11,6 (1)	112,4 (1)	135,4 (2)	118,3 (1)

A Tabela 4.5 apresenta os comprimentos das lesões e os respectivos *rankings* dos genótipos em cada experimento pelo método indireto utilizando solução de ácido oxálico. Podemos observar a grande flutuação nos rankings dos genótipos entre os experimentos. BMX Turbo RR, por exemplo, passa de terceiro mais suscetível, na primeira repetição, para o mais resistente (experimentos 4 e 5) ou segundo mais resistente (experimentos 2 e 3). Comportamento inconsistente ocorre em outros genótipos dentro deste método, como a BMX Veloz RR, que se caracteriza como resistente, suscetível ou intermediário, dependendo do experimento analisado. Genótipos como TMG 7161, BMX

Energia RR, BMX Ativa RR apresentaram comportamento de suscetibilidade inesperado, uma vez que vinham se mantendo com bom nível de resistência à doença.

Um fator observado durante a execução e avaliação da metodologia foi a diferença de tenacidade e espessura das hastes submetidas à solução de ácido oxálico, características inerentes a cada genótipo. Assim, notou-se maior resistência à descoloração da haste em cultivares de hastes mais lignificadas e espessas, como BMX Turbo RR, o que pode explicar os resultados atípicos encontrados.

Tabela 4.5 – Comprimento (mm) da descoloração de hastes de plântulas de soja submetidas à solução de ácido oxálico 20 mM em cinco experimentos independentes. Os números entre parênteses representam o ranking dos genótipos dentro de cada experimento, sendo o menor valor correspondente ao material mais resistente.

Genótipos	Comprimento da descoloração das haste (mm)				
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5
NS 5959 IPRO	98,2 (16)	72,5 (16)	72,7 (7)	77,7 (13)	110,3 (15)
TMG 7161	96,3 (15)	59,3 (11)	90,5 (14)	88,2 (16)	93,5 (13)
BMX Turbo RR	93,8 (14)	48,3 (2)	69,8 (2)	70,5 (1)	62,2 (1)
BMX Energia RR	88,0 (13)	58,8 (10)	88,5 (13)	76,7 (11)	75,0 (6)
BMX Ativa RR	83,8 (12)	64,8 (14)	81,8 (10)	81,3 (15)	72,6 (3)
TMG 7062	78,5 (11)	52,5 (5)	109,7 (15)	74,8 (5)	73,3 (4)
BMX Vanguarda IPRO	77,0 (10)	45,5 (1)	71,8 (5)	77,0 (12)	73,5 (5)
6458 RSF IPRO	73,8 (9)	65,8 (15)	70,8 (3)	72,7 (2)	113,2 (16)
A 5909 RG	73,0 (8)	55,3 (7)	64,7 (1)	76,5 (10)	69,2 (2)
M 5917 IPRO	72,7 (7)	62,2 (13)	76,3 (8)	75,3 (6)	75,2 (7)
BMX Apolo RR	70,0 (6)	56,0 (8)	71,3 (4)	75,6 (8)	91,7 (12)
BMX Elite IPRO	67,5 (5)	60,0 (12)	76,7 (9)	75,8 (9)	82,2 (10)
NS 4823 RG	66,8 (4)	49,2 (4)	72,2 (6)	74,7 (4)	81,3 (9)
BMX Alvo RR	64,3 (3)	54,8 (6)	82,2 (11)	74,3 (3)	98,8 (14)
DM 4301	62,5 (2)	58,8 (9)	82,8 (12)	78,3 (14)	84,5 (11)
BMX Veloz RR	42,0 (1)	48,5 (3)	127,5 (16)	75,5 (7)	75,8 (8)

Ao analisarmos as correlações com os dados de severidade observados no campo (Tabela 4.6), vemos que, nenhum experimento independente apresentou correlação significativa positiva com o observado em condições de campo. O experimento 3, inclusive, apresentou correlação significativa negativa, o que significa que os resultados foram significativamente, inversos aos observados no campo. Deste modo, esta metodologia não é indicada para realizar triagem de materiais resistentes a *S. sclerotiorum*.

Hüller et al. (2016), compararam o método da resposta ao ácido oxálico com três métodos tradicionais de avaliação de doenças: folhas destacadas; método sem ferimento, com disco de micélio fixado na axila do primeiro trifólio; e corte da haste e deposição de disco de micélio. Os autores observaram comportamentos diferentes dos genótipos dependendo do método de inoculação utilizado, porém, o *ranking* dos mesmos nos diferentes métodos apresentou forte correlação. Entre os genótipos avaliados, quatro foram também avaliados no presente trabalho (BMX Apolo RR, BMX Turbo RR, BMX Energia RR e BMX Ativa RR) e apresentaram resultados divergentes, uma vez que, comparando entre si, os autores apontaram BMX Apolo RR e BMX Energia RR como mais suscetíveis do que BMX Turbo RR e BMX Ativa RR.

Tabela 4.6 – Coeficiente de correlação (r_s) e p-valor de correlações de Spearman entre os dados de severidade em cada experimento independente de cada método de inoculação e resultados de severidade média obtidos em ensaios realizados em condições de campo naturalmente infestados (Arapoti-PR safras 2014/15 e 2015/16; e Papanduva-SC safras 2014/15, 2015/16 e 2016/17).

Método	Exptos.	Correlação de Spearman	
		r_s	p-valor
Punção da haste com palito colonizado	1	0,429	0,000
	2	0,093	0,438
	3	-0,044	0,711
	4	0,076	0,525
	5	-0,136	0,254
Disco de micélio em ponteira sobre a haste cortada	1	0,102	0,394
	2	0,368	0,002
	3	0,091	0,448
	4	0,365	0,002
	5	0,383	0,001
Descoloração da haste pelo ácido oxálico	1	0,201	0,091
	2	0,018	0,880
	3	-0,304	0,010
	4	0,076	0,523
	5	-0,085	0,476

Muitas pesquisas referentes a metodologias de inoculação de *S. sclerotiorum* constataram variação no ranking de resistência dos genótipos, entre e dentro dos métodos (WEGULO; YANG; MARTINSON, 1998; CHEN; WANG, 2005; JULIATTI; SAGATA; JULIATTI, 2013). Segundo Wegulo, Yang e Martinson (1998) as razões para essas variações no *ranking* das cultivares entre diferentes métodos de avaliação em condições de campo e ambiente controlado são, em parte, devidos às diferenças nas reações de defesa entre as cultivares. Algumas cultivares podem variar quanto a sua estratégia de defesa, dependendo das condições ambientais ou o método de avaliação da resistência empregada e até mesmo a duração do período de florescimento.

Os mesmos autores sugeriram que os métodos baseados na determinação do comprimento da descoloração na haste causada por ácido oxálico ($r = 0,42$) foram melhores e mais confiáveis do que o método da inoculação do disco de micélio na haste ($r = -0,20$) ou suspensão de micélio nas folhas ($r = 0,40$), para avaliação de cultivares de soja devido à repetibilidade e correlação com dados de severidade a campo, no que diz respeito à resistência ao mofo-branco.

Os moderados valores de correlação encontrados entre resultados de condições controladas e de campo aumentam a evidência de trabalhos prévios, sugerindo que muitos testes em casa de vegetação e laboratório devam ser exaustivamente testados para que um método possa ser considerado confiável para a correta identificação e caracterização da resistência no campo.

4.6 CONCLUSÕES

Entre os métodos avaliados, a inoculação do disco de micélio em ponteira sobre a haste cortada é o mais indicado para seleção de genótipos de soja resistentes ao mofo-branco, por apresentar repetibilidade e maior correlação com dados de severidade em ensaios de campo naturalmente infestados.

5 ARTIGO C – AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM GENÓTIPOS DE SOJA

5.1 RESUMO

Em soja [*Glycine max* (L.) Merrill], o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary causa o mofo-branco, também conhecido como podridão-de-esclerotínia, uma importante doença capaz de afetar o rendimento. Epidemias desta doença são altamente dependentes de condições ambientais favoráveis de alta umidade e temperatura moderada. O controle desta é complexo por se tratar de um fungo altamente agressivo, cosmopolita e polífago, capaz de infectar mais de 400 espécies vegetais, muitas delas cultivadas, como feijão, girassol, amendoim, algodão e hortaliças, além da capacidade de formar estruturas de resistência denominadas escleródios, que garantem sua sobrevivência. Até o momento não foram desenvolvidas cultivares comerciais totalmente resistentes ao mofo-branco, portanto, o controle da doença atualmente inclui o uso de cultivares com resistência parcial, controle cultural e químico. Diversos métodos de inoculação em campo e ambientes controlados vêm sendo estudados a fim de detectar esta resistência, mas a correlação dos resultados entre ambientes se mostra pouco consistente. Entre os fatores que podem interferir nesta diferença de respostas entre os ambientes, estão, principalmente, a metodologia de inoculação empregada e a variabilidade na agressividade de isolados. Este trabalho teve por objetivo verificar níveis de agressividade de isolados de *S. sclerotiorum* provenientes de lavouras comerciais de soja do Brasil, bem como averiguar a interação dos mesmos com genótipos de soja, em resposta à inoculação em ambiente controlado. Doze isolados de *S. sclerotiorum* obtidos de lavouras de soja comerciais de várias regiões do Brasil foram inoculados, pelo método do palito colonizado, em plântulas de soja de quatro cultivares. Foi possível observar interação significativa entre os fatores isolado e genótipo, e diferenças de agressividade entre os isolados, porém, nem todos permitiram discriminar diferenças de suscetibilidade entre os genótipos de soja. Numa segunda etapa, três isolados foram selecionados de acordo com suas agressividades no primeiro ensaio, e foram então inoculados, pelo método do disco de micélio em ponteira sobre a haste cortada, em dezoito genótipos de soja. Desta vez, não houve interação significativa entre os fatores. O isolado 15 foi mais agressivo que o 28 e o 603, que não diferiram entre si. Os três isolados permitiram detectar diferenças entre os cultivares, porém, o ranking de suscetibilidade dos genótipos de soja oscilou. Os resultados confirmam a variação de níveis de resistência conforme o método de inoculação e isolado utilizados, o que mostra a importância de adaptações e incansáveis repetições no desenvolvimento de protocolos de metodologias de inoculação, bem como a escolha criteriosa dos isolados a serem utilizados.

Palavras-chave: *Glycine max*. Método do palito. Método do corte da haste. Mofo-branco da soja.

5.2 ABSTRACT

In soybean [*Glycine max* (L.) Merrill], the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary causes the sclerotinia stem rot, also known as white mold, an important yield-reducing disease. This disease epidemics are highly dependent on favorable environmental conditions of high humidity and moderate temperature. The disease control is complex because this fungus is highly aggressive, cosmopolitan and polyphagous, capable of infecting more than

400 plant species, many of them cultivated, such as bean, sunflower, peanut, cotton and vegetables, as well as it has the ability to form structures called sclerotia, which guarantee their survival in soil. To date, commercial cultivars completely resistant to white mold have not been developed, therefore, the currently control method includes the use of cultivars with partial resistance, cultural and chemical control. Several methods of inoculation, at field and controlled environments, have been studied in order to detect this resistance however, the correlation of the results between environments is not consistent. Many factors can interfere in the different responses between the environments, mainly the inoculation methodology employed and the aggressiveness variability of pathogen isolates. The objective of this study was to verify the level of aggressiveness of *S. sclerotiorum* isolates as well as to investigate their interaction with soybean genotypes, in response to inoculation at controlled environment. Twelve *S. sclerotiorum* isolates from commercial soybean fields from varied regions of Brazil were inoculated in four soybean cultivars plants using the stem puncture with colonized toothpick method. It was possible to observe significant interaction between the factors isolates and genotype, and differences of aggressiveness among the isolates, however, not all isolates allowed to discriminate differences in susceptibility among the genotypes. In a second step, three isolates were selected according to their aggressiveness in the first assay, and then were inoculated, using the mycelium disc on cut stem method, into eighteen soybean genotypes. In this experiment, there was no significant interaction between the factors. Isolate 15 was more aggressive than 28 and 603, which did not differ from each other. The three isolates allowed to detect differences among the cultivars, however, the susceptibility ranking oscillated. The results confirm the variation of resistance levels according to the inoculation method employed and isolate used, which shows the importance of adaptations and tireless repetitions in the development of inoculation methodologies protocol, as well as the careful selection of the isolates to be used.

Keywords: *Glycine max*. Cut stem method. Toothpick method. Soybean white mold.

5.3 INTRODUÇÃO

Em soja [*Glycine max* (L.) Merrill], o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary causa o mofo-branco, também conhecida como podridão-de-esclerotínia, uma importante doença capaz de afetar o rendimento. Epidemias desta doença são altamente dependentes de condições ambientais favoráveis, que ocorrem, principalmente, quando clima úmido e temperaturas moderadas ocorrem durante o florescimento (GRAU; HARTMAN, 1999).

O mofo-branco é uma doença de difícil controle, devido, principalmente, à formação de estruturas de resistência, denominadas escleródios, que garantem a sobrevivência do patógeno por longos períodos no solo. (GARCIA, 2008).

Por este patógeno apresentar uma alta agressividade, não existem cultivares de soja completamente resistentes, porém algumas podem apresentar resistência parcial (DORRANCE; MILLS, 2008; ESKER et al., 2011; FARIAS NETO et al., 2008). A utilização

de variedades com resistência parcial é um dos mais efetivos métodos de controle de mofo-branco da soja (KURLE et al., 2001).

Segundo Terán e Singh (2009), qualquer método de detecção da resistência fisiológica depende da idade da planta no momento da avaliação, parte da planta inoculada, agressividade do patógeno, tipo de inóculo e tempo entre a inoculação e a avaliação.

Muitos métodos de inoculação vêm sendo desenvolvidos para avaliar a resistência a *S. sclerotiorum*, e os métodos podem afetar a resposta das cultivares. Avaliações em casa de vegetação e laboratório são muitas vezes realizadas como parte integrante de metodologias de triagem de resistência a *S. sclerotiorum* (KIM et al., 2000; VUONG et al., 2004). No entanto, os resultados de seleção em campo e casa de vegetação não mostram estar consistentemente correlacionados (BOLAND; HALL, 1987; CHUN; KAO; LOCKWOOD, 1987).

Entre os motivos das divergências entre os resultados de campo e casa de vegetação está o alto nível de variabilidade entre os isolados de *S. sclerotiorum* (KOHN et al., 1991; GOMES et al., 2011; LITHOLDO JÚNIOR et al., 2011). Variação na agressividade de isolados dentro e entre diferentes campos de coleta pode influenciar a avaliação fenotípica de linhagens/cultivares resistentes a esse patógeno, contribuindo para resultados inconsistentes entre os locais (ABREU, 2011; OTTO-HANSON et al., 2011).

A agressividade patogênica pode ser avaliada por diversas formas, tais como: eficiência de infecção, período latente, taxa de produção de esporos e tamanho da lesão (PARIUAD et al., 2009). Kull et al. (2004) identificaram diferenças na agressividade de isolados de *S. sclerotiorum* em campos de soja em Illinois e destacaram a importância de se examinar a agressividade de isolados dentro de campos naturalmente infectados para se explicar os resultados controversos obtidos durante as avaliações de linhagens/cultivares resistentes.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi verificar níveis de agressividade de isolados de *S. sclerotiorum* provenientes de lavouras comerciais de soja do Brasil, bem como averiguar a interação dos mesmos com genótipos de soja, em resposta à inoculação em ambiente controlado.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi realizado em casa de vegetação e laboratório na empresa GMD Genética do Brasil, localizado no município de Cambé-PR. Durante a safra 2014/15 amostras

de plantas com sintomas de mofo-branco e de escleródios provenientes de campos de soja infestados foram coletados nas diversas regiões produtoras do Brasil, e enviados ao laboratório. As amostras foram devidamente armazenadas, e, posteriormente o fungo *S. sclerotiorum* foi isolado em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar).

Os isolados obtidos a partir de plantas de soja com sintomas típicos de mofo-branco com seu número de identificação e o local de coleta das plantas são apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Identificação e local de coleta de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* obtidos a partir de plantas de soja com sintomas típicos de mofo-branco coletados em campos de cultivo no Brasil na safra 2014/2015.

Isolado	Origem (município/UF)
15	Faxinal Guedes/SC
16	Arapoti/PR
17	Candói/PR
26	Abelardo Luz/SC
28	Vacaria/RS
29	Vacaria/RS
34	Formosa do Rio Preto/BA
35	Ciríaco/RS
37	Vacaria/RS
38	Castro/PR
39	Castro/PR
603	Papanduva/SC

Primeiramente, foram realizados testes com os doze isolados em quatro cultivares de soja escolhidas pelo nível de suscetibilidade determinado em ensaios prévios realizados em campo. BMX Turbo RR foi escolhido como suscetível, BMX Apolo RR como moderadamente suscetível, e BMX Veloz RR e TMG 7161, pouco suscetíveis.

As cultivares foram semeadas em vasos plásticos de 0,75L de capacidade preenchidos com mistura autoclavada de solo e areia (1:3 v/v). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial, com três repetições mais uma testemunha não inoculada.

As inoculações foram realizadas pelo método da punção da haste com palito colonizado, em plântulas de 14 dias de idade e ausência de câmara úmida após a inoculação.

O método da punção da haste baseou-se em metodologia descrita por

Hildebrand (1953), com variações referidas por Tolêdo-Souza e Costa (2003). Para isso, pontas de palitos de dente com 1,5 cm de comprimento foram inseridas verticalmente em discos de papel de filtro com o mesmo diâmetro interno de uma placa de Petri. Placas contendo os palitos em papel, com a parte afilada voltada para cima, foram então autoclavadas a 121° C por trinta minutos. Sobre os palitos foi vertido meio de cultura BDA, mantendo exposta cerca de 2 mm da extremidade dos palitos. Após solidificação do meio, cinco discos de micélio de *S. sclerotiorum* foram distribuídos equidistantemente, e as placas incubadas a 20°C, por cinco dias.

No momento da inoculação, os palitos, totalmente cobertos por micélio, foram removidos das placas com auxílio de pinça e inseridos na haste principal das plantas de soja, cerca de 2 cm abaixo da cotilédones. Nas plantas controle não inoculadas, foram inseridos palitos limpos autoclavados. As plantas foram mantidas em sala climatizada a 20°C e as avaliações foram realizadas pela contagem das plantas mortas aos seis dias após a inoculação. Os dados de incidência (%), obedecendo os pressupostos de homogeneidade e normalidade dos resíduos, foram submetidos à análise fatorial e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Numa segunda etapa, foram selecionados três isolados dos doze, distintos em grau de agressividade. Os isolados selecionados foram então testados com os seguintes genótipos: BMX Turbo RR, BMX Apolo RR, BMX Elite IPRO, BMX Alvo RR, BMX Ativa RR, BMX Energia RR, 6458 RSF IPRO, NS 5959 IPRO, BMX Vanguarda IPRO, A 5909 RG, DM 4301, TMG 7062, TMG 7161, M 5917 IPRO, BMX Veloz RR, NS 4823 RG, Williams e Corsoy.

Utilizou-se o método do disco de micélio em ponteira sobre a haste cortada, baseado na metodologia descrita por Twizeyimana et al. (2012) para inoculação de *Macrophomina phaseolina* em soja. Este método foi utilizado com para plantas com 42 dias de idade, cultivadas em vasos de 1,3 L de capacidade contendo mistura de solo e areia (1:3 v/v) autoclavada.

O inóculo foi preparado repicando-se discos de micélio de colônias de *S. sclerotiorum* para placas de Petri contendo meio de cultura BDA, e incubado a 20°C por cinco dias. Para a inoculação, o meio de cultura com o fungo crescido foi virado dentro da placa de petri, de modo que a superfície contendo micélio ficasse para baixo. Então, o bocal de ponteiros de pipeta (200µL) foi inserido no meio de cultura, somente nas margens da colônia, de modo a obter discos de micélio na região de ativo crescimento do fungo. A ponteira contendo o inóculo foi pressionada sobre a haste de cada planta previamente cortada

com tesoura desinfestada, 2,5 cm acima do nó unifoliolar. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 18 (isolados x genótipos), totalizando 54 tratamentos, com três repetições mais um controle não inoculado, em que foram inseridas sobre a haste cortada ponteiros contendo somente meio de cultura BDA.

As plantas foram mantidas em bancada de sala climatizada a 20°C, fotoperíodo de 12h/12h, sem câmara úmida, regando-se solo quando necessário. Sete dias após a inoculação as ponteiros foram retiradas e iniciaram-se avaliações do comprimento das lesões diariamente, até os 12 dias após a inoculação. Os dados de comprimento das lesões foram verificados quanto à homogeneidade e normalidade dos resíduos, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do primeiro ensaio, referentes à morte de plântulas por *S. sclerotiorum* (incidência), em quatro cultivares, são apresentados na Tabela 5.2. Segundo os dados, foi possível observar interação significativa entre os fatores, indicando que a morte de plântulas por *S. sclerotiorum* pelo método de inoculação da punção da haste com palito colonizado, depende do genótipo x isolado estudado.

Numericamente, os isolados mais agressivos foram o 16, 39 e 15, e os menos agressivos o 603 e 17. Em relação às cultivares, BMX Apolo RR foi mais suscetível, seguida por BMX Turbo RR, BMX Veloz RR e TMG 7161.

A agressividade dos isolados não parece estar relacionada com a proximidade dos locais de coleta, uma vez que, isolados provenientes do mesmo município, por exemplo, de Castro-PR (38 e 39), apresentaram médias de incidência muito diferentes (26,39% e 63,89%, respectivamente). Diferentemente, Auclair et al. (2004) concluíram que os resultados de seu estudo foram consistentes com a prática de considerar diferentes isolados de *S. sclerotiorum* amostrados de soja na mesma região geográfica como equivalente para a avaliação de cultivares de soja para resistência ao mofo-branco, pois não constataram diferenças significativas na severidade da doença entre os isolados e interação entre cultivar e isolado.

Tabela 5.2 – Incidência (%) de morte de plântulas inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* pelo método da punção da haste com palito colonizado, utilizando doze isolados do fungo e quatro cultivares de soja.

Isolados	Genótipos				Média
	BMX Turbo RR	BMX Apolo RR	BMX Veloz RR	TMG 7161	
15	88,9 aA ¹	72,2 abAB	33,3 abC	44,4 abcBC	59,7
16	66,7 abA	66,7 abcA	66,7 aA	55,6 abA	63,9
17	5,6 cA	27,8 bcA	5,6 bA	11,1 bcA	12,5
26	22,2 bcA	22,2 cA	33,3 abA	27,8 abcA	26,4
28	44,4 abcAB	66,7 abcA	27,8 abB	33,3 abcAB	43,1
29	38,9 bcA	22,2 cA	44,4 abA	27,8 abcA	33,3
34	61,1 abAB	83,3 aA	44,4 abB	33,3 abcB	55,6
35	50,0 abcAB	66,7 abcA	50,0 abAB	27,8 abcB	48,6
37	33,3 bcB	83,3 aA	50,0 abAB	50,0 abAB	54,2
38	38,9 bcA	33,3 bcA	5,6 bA	27,8 abcA	26,4
39	66,7 abA	55,6 abcA	72,2 aA	61,1 aA	63,9
603	11,1 cAB	38,9 abcA	5,6 bAB	0,0 cB	13,9
Média	44,0	53,2	36,6	33,3	CV (%) 41,38

¹ Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 1% de probabilidade.

Podemos observar ainda, que o ranking dos genótipos para os referidos isolados foi inverso, com BMX Veloz RR sendo a cultivar mais resistente para o isolado 38, porém, a mais suscetível para o 39, o que pode ser explicado pela interação significativa entre genótipo e isolado.

Kull et al. (2003), estudaram três métodos de inoculação, três cultivares de soja e 6 isolados de *S. sclerotiorum* e detectaram interação significativa entre os fatores isolado e cultivar somente para o método do corte da haste, não havendo interação para os métodos de inoculação no cotilédone ou folha destacada.

Outros autores também não encontraram interação significativa entre os fatores em questão. Pratt e Rowe (1995) estudaram diversos isolados de *S. sclerotiorum* e *S. trifoliorum* que diferiram nos graus de virulência em cultivares de alfafa. Observaram interações entre experimento x cultivar e experimento x isolado, mas não na interação isolado x cultivar. Nelson, Helms e Kural (1991) constataram patogenicidade de 10 isolados de *S. sclerotiorum* ao inocularem hastes de soja, mas somente três isolados determinaram diferença significativa para severidade da doença entre cultivares, sem interação entre os fatores.

Os isolados 16, 17, 26, 29, 38 e 39 não permitiram identificar diferenças de

suscetibilidade entre as cultivares. Para o isolado 15, BMX Turbo RR foi mais suscetível que BMX Veloz RR e TMG 7161; para o isolado 28, BMX Apolo RR foi mais suscetível que BMX Veloz RR; para o isolado 34, BMX Apolo RR foi mais suscetível que BMX Veloz RR e TMG 7161; para o isolado 35, BMX Apolo RR foi mais suscetível que TMG 7161, e o mesmo ocorreu para o isolado 603. O isolado 37 apresentou comportamento atípico, com BMX Turbo RR sendo mais resistente que BMX Apolo, uma vez que, para os demais isolados, o grau de suscetibilidade das mesmas não pode ser distinguido.

Tolêdo-Souza e Costa (2003), utilizando metodologia do palito colonizado, mas em plantas de feijoeiro, observou que não houve diferença entre os dois isolados estudados. Nos demais métodos (inoculação de folhas, axilas e flores) foi possível observar maior agressividade de um dos isolados.

Analisando dentro de cada cultivar, observamos que os isolados 17 e 603 foram os menos agressivos, com exceção do isolado 603 para BMX Apolo RR, que não pode ser diferenciada das demais cultivares.

Numa segunda etapa deste trabalho, os isolados 15, 28 e 603 foram escolhidos devido à variação do grau de agressividade (isolado 15 como altamente agressivo, 28 como moderadamente e 603 como pouco agressivo), para serem testados novamente, agora em 18 cultivares de soja.

A análise dos dados deste segundo ensaio novamente permitiu identificar interação significativa entre os fatores genótipo e isolado (Tabela 5.3). A interação entre os fatores indica que o comprimento da lesão depende do conjunto isolado x genótipo em questão.

Numericamente, o isolado 15 foi mais agressivo que o 28 e o 603, apesar de não haver diferença entre os mesmos para a maioria dos genótipos. Somente para A 5909 RG e M 5917 IPRO o isolado 15 foi significativamente o mais agressivo. Para BMX Veloz RR e DM 430, o isolado 28 não diferiu do mais agressivo (15) nem do menos agressivo (603). Comparando os isolados 28 e 603, foi possível observar diferença na agressividade somente para M 5917 IPRO e Corsoy, para os quais 603 foi mais agressivo que 28.

Tabela 5.3 – Comprimento das lesões (cm.) nas hastes de 18 genótipos de soja inoculadas com três isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* utilizando o método do disco de micélio em ponteira sobre a haste cortada.

Genótipo	Isolado 15	Isolado 28	Isolado 603	Média
BMX Energia RR	142,9 aA ¹	142,6 aA	138,3 aA	141,3
BMX Turbo RR	148,1 aA	152,7 aA	137,7 aA	146,2
BMX Apolo RR	141,9 aA	127,2 aA	134,5 aA	134,6
A 5909 RG	162,1 aA	133,1 aB	133,0 aB	142,7
NS 4823 RG	145,1 aA	134,3 aA	131,3 aA	136,9
BMX Vanguarda IPRO	118,2 bA	127,4 aA	129,1 aA	124,9
BMX Ativa RR	130,5 aA	118,7 aA	126,7 aA	125,3
BMX Elite IPRO	134,1 aA	130,3 aA	125,1 aA	129,8
Williams 82	137,5 aA	135,1 aA	120,1 aA	130,9
TMG 7161	135,3 aA	137,0 aA	119,3 aA	130,6
NS 5959 IPRO	127,7 aA	135,7 aA	116,7 aA	126,7
BMX Veloz RR	143,9 aA	131,8 aA	116,1 aB	130,6
DM 4301	147,0 aA	126,7 aB	113,7 aB	129,1
BMX Alvo RR	116,8 bA	91,2 bA	108,6 bA	105,5
M 5917 IPRO	133,8 aA	57,6 cC	101,0 bA	97,5
6458 RSF IPRO	112,7 bA	109,5 aA	98,8 bA	10,0
Corsoy	86,7 cA	47,7 cB	93,5 bA	76,0
TMG 7062	101,5 cA	74,8 bA	90,2 bA	88,8
Média	131,4	117,4	118,5	CV (%) 10,79

¹ Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelos testes de Tukey e Scott-Knott, respectivamente, ambos a 1% de probabilidade.

Diferenças de agressividade foram relatadas entre isolados de *S. sclerotiorum* para soja (KULL et al., 2004; KOGA et al., 2014), canola (KOHLI et al., 1995) e girassol (EKINS et al., 2011; MARCIANO et al., 1983), enquanto a ausência de variações de agressividade foram relatadas entre isolados coletados do Canadá (AUCLAIR et al., 2004) e Estados Unidos (KOGA et al., 2014) e inoculados em soja.

Por outro lado, Miklas *et al.* (1992), utilizando hastes cortadas do feijoeiro para medir a virulência de dezoito isolados de *S. sclerotiorum*, concluíram que esses isolados não diferiram estatisticamente quanto à virulência avaliada pelo comprimento da lesão ocasionada na haste.

Segundo Karl (1997), para a maioria das cultivares por ela avaliados pelos métodos do alfinete e do palito não foi observada diferença estatística entre os isolados. Resultados semelhantes foram obtidos por Tolêdo-Souza e Costa (2003) para o método de

inoculação utilizando palito colonizado, que não apresentou diferenças estatísticas entre os isolados utilizados. Ainda no mesmo estudo, Tolêdo-Souza e Costa (2003) constataram diferença de virulência entre isolados para os métodos de inoculação das folhas primárias, inoculação as axilas das plântulas e inoculação das flores com ascósporos. Os autores ressaltam assim, a importância de escolha criteriosa de isolado para validar uma técnica de inoculação.

Koga et al. (2014) observaram diferenças quanto à agressividade de isolados de *S. sclerotiorum* provenientes do Brasil e dos Estados Unidos, sem interação entre os fatores genótipo e isolado. A classificação das cultivares permaneceu a mesma, independentemente da diversidade genética, da diferença quanto à agressividade e da região ou país de origem do isolado.

Os três isolados permitiram diferenciar graus de suscetibilidade entre as cultivares. O isolado 15 e o 28 segregaram os genótipos em três classes de suscetibilidade, enquanto o 603, apenas em duas. Para o isolado 15, os mais resistentes foram Corsoy e TMG 7062, seguidos por BMX Alvo RR e 6458 RSF IPRO; para o 28, M 5917 IPRO e Corsoy, seguidos por BMX Alvo RR e TMG 7062; para o 603, BMX Alvo RR, M 5917 IPRO, 6458 RSF IPRO, Corsoy e TMG 7062 se comportaram como os menos suscetíveis.

Conforme o apresentado, podemos observar que a maioria dos genótipos comportou-se como suscetível, para ambos os isolados utilizados, não sendo possível apontar padrões de suscetibilidade. No entanto, os comportamentos de Corsoy e TMG 7062 permites destacá-los como padrões de resistência.

Juliatti et al. (2014) inocularam plantas de soja com sete isolados de *S. sclerotiorum* (seis provenientes de lavouras de soja comerciais e um de sementes de girassol), observaram variações no ranking de suscetibilidade dos genótipos, conforme o isolado utilizado. Todos os isolados foram capazes de discriminar níveis distintos de suscetibilidade entre os genótipos, mas o ranking não foi semelhante.

Kull et al. (2003), inoculando seis isolados de *S. sclerotiorum* também pelo método do corte da haste, indentificaram que, cinco deles permitiram diferenciar a severidade da doença entre as cultivares, mas enfatiza que, a correta identificação da resistência ou suscetibilidade de soja ou feijão em ambiente controlado é dependente do método de *screening* empregado e da escolha do isolado de *S. sclerotiorum*.

5.6 CONCLUSÕES

Os isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* variam em agressividade segundo o genótipo de soja e o método de inoculação utilizado;

O nível de agressividade foi dependente da interação entre os fatores envolvidos (genótipo e isolado);

O *ranking* de suscetibilidade dos genótipos depende do isolado utilizado, no entanto, Corsoy e TMG 7062 podem ser considerados padrões de resistência, para os isolados utilizados.

6 ARTIGO D – INOCULAÇÃO DE *Macrophomina phaseolina* EM SEMENTES DE SOJA PARA SELEÇÃO DE GENÓTIPOS RESISTENTES À PODRIDÃO-DE-CARVÃO

6.1 RESUMO

A podridão-de-carvão da soja, também conhecida por podridão-negra ou podridão-cinzenta da raiz, é uma doença radicular de ocorrência generalizada em todas as regiões de cultivo de soja do mundo. O agente causal é o fungo *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goidanish, polífago, cosmopolita, habitante natural do solo, de grande variabilidade patogênica e alta capacidade de sobrevivência sob condições adversas e, portanto, de difícil controle. É favorecido por condições de alta temperatura e baixa umidade do solo. Não há fungicidas registrados nem materiais geneticamente resistentes a esta doença, mas diferenças de suscetibilidade têm sido constatadas. A seleção a campo de materiais resistentes à podridão-de-carvão torna-se pouco confiável, uma vez que muitos fatores externos podem afetar o comportamento das plantas e do fungo, entre locais e anos. Seleção de variedades com resistência à podridão causada por *M. phaseolina* em casa de vegetação apresenta maior uniformidade e estabilidade dos resultados, uma vez que as condições são controladas. No entanto, é recomendado que os resultados obtidos em ambiente protegido, para serem adotados como protocolo de *screening*, apresentem boa correlação com resultados obtidos em campo. Por tratar-se de um patógeno transmitido por semente, métodos baseados em inoculação das mesmas podem oferecer eficiência e rapidez de resultados, mas existem escassos estudos para esta doença em soja. Assim, este trabalho teve por objetivo verificar a eficiência da infestação de sementes de soja pela incubação em contato com colônias de *M. phaseolina* por 48 horas, comparar dois ambientes de germinação (semeadura em rolo de papel para germinação ou em substrato, em vasos, em casa de vegetação), e correlacionar a germinação relativa de genótipos em ambos os métodos com a severidade de podridão-de-carvão observada em ensaio de campo realizado em Sertaneja-PR. Quarenta e oito horas de contato das sementes com o fungo foram suficientes para infestação das mesmas, reduzindo a germinação em relação ao controle não inoculado. A germinação em rolo de papel aos 5 dias após semeadura (DAS) no germinador foi maior que a germinação em vasos contendo mistura de solo e areia aos 8 DAS em casa de vegetação. Ambos os ambientes apresentaram alta correlação negativa entre a germinação da semente e a severidade no campo ($r = -0,775$ em rolo de papel e $r = -0,779$ em vaso com substrato). Indica-se realizar o teste de germinação em rolo de papel devido à praticidade, economia de espaço, material e mão de obra, além do maior controle das condições a que são submetidas as sementes.

Palavras-chave: Germinação. *Glycine max*. Podridão-negra-da-raiz.

6.2 ABSTRACT

Soybean charcoal rot, also known as black root rot or gray root rot, is a widespread root disease in all regions of soybean cultivation of the world. The causal agent is the fungus *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goidanish, polyphagous, cosmopolitan, natural inhabitant of the soil, with great pathogenic variability and high survival capacity under adverse conditions and, therefore, difficult to control. It is favored by high temperature conditions and low soil moisture. There are no registered fungicides or genetically resistant cultivars to this disease, but differences in susceptibility have been observed. Screening for black root rot resistance in field conditions becomes unreliable, since many external factors can affect the

behavior of plants and fungus, from place to place and from year to year. Screening under greenhouse conditions provides more uniform and stable results, once environmental conditions are controlled. However, to be adopted as a screening protocol it is recommended that data obtained at controlled conditions have high correlation with field data. Once *M. phaseolina* is a seed-borne pathogen, methods based on seed inoculation could be efficient and provide quick results, but still has few studies on this disease in soybean. The aim of this study was to verify the efficiency of soybean seeds infestation by contact with *M. phaseolina* colonies for 48 hours, to compare two environments of germination (sowing on germination paper roll or in soil and sand in pots at greenhouse), and to correlate the relative germination of genotypes in both methods with the severity of charcoal rot at field trial in Sertaneja-PR. Forty eight hours of seeds contact with the fungus were enough to infest them, reducing the germination comparing with the uninoculated seeds. Germination in paper roll at germinator 5 days after sowing (DAS) was higher than germination in pots containing a soil and sand mixture at 8 DAS at greenhouse. Seed germination in both conditions showed high and negative correlation with field severity ($r = -0.775$ for paper roll and $r = -0.779$ for soil and sand at greenhouse). Thus, paper roll germination test is recommended due to the practicality, economy of space, material and workmanship, besides the greater control of the conditions to which the seeds are submitted.

Keywords: Germination. *Glycine max*. Black root rot.

6.3 INTRODUÇÃO

Dentre as mais de quarenta doenças relacionadas à cultura da soja já relatadas no Brasil, treze ocorrem no sistema radicular a partir de patógenos habitantes do solo, entre elas a podridão-de-carvão, causada por *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goidanish (ALMEIDA et al., 2001). Também conhecida por podridão-negra-da-raiz ou podridão-cinza-da-raiz, esta doença radicular tem ocorrência generalizada em todas as regiões de cultivo da soja no mundo.

O fungo *M. phaseolina* é polífago, cosmopolita e ataca inúmeras espécies de plantas cultivadas, entre elas: milho, soja, sorgo, amendoim, caupi, gergelim, feijão comum, entre outras (MACHADO, 1980) e, em quase todas essas espécies, o fungo é eficientemente transmitido por suas sementes (ANDRUS, 1938; SANTOS et al., 1984). Caracteriza-se por produzir microescleródios, responsáveis pela sobrevivência do patógeno em condições adversas ou na ausência de hospedeiro suscetível constituindo a principal fonte de inóculo primário, pois ficam no solo, nas sementes e em restos de cultura (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; VIANA, 1996; NDIAYE, 2007; GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012). Os microescleródios são formados pela compactação de hifas, de coloração escura devido a

presença de melanina, que se formam em grande abundância nos tecidos radiculares infectados, conferindo aspecto encarvoado ou cinzento às raízes infectadas.

Trata-se de um organismo patogênico habitante natural do solo capaz de infectar as plantas de soja em diferentes estágios de desenvolvimento, porém os sintomas aparecem principalmente na fase de florescimento e enchimento de grãos, em forma de reboleiras na lavoura (GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012). É favorecido por condições de alta temperatura e baixa umidade do solo, ou seja, clima quente e períodos de seca.

Os sintomas se evidenciam normalmente no final do ciclo da cultura e se confundem com o estágio de senescência das plantas. Por este motivo, a doença pode passar despercebida nas lavouras (ALMEIDA et al., 2001). As plantas sintomáticas que não morrem formam reboleiras ou faixas apresentando folhas amareladas e posteriormente ramos caídos com as folhas murchas presas às hastes (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; NDIAYE, 2007; ALMEIDA, 2001). Devido a que a infecção e o desenvolvimento inicial das doenças causadas por patógenos radiculares ocorrem abaixo do nível do solo, os sintomas geralmente são notados apenas quando atingem estados avançados, o que limita as opções de controle.

Segundo Kimati e Bergamin Filho (2011) a utilização de cultivares resistentes constitui uma das mais importantes medidas a serem incorporadas no manejo das doenças. É sempre a medida mais econômica, pois não acarreta aumento significativo nos custos de produção, além de ser compatível com outros métodos de controle. No entanto, nenhuma fonte de resistência genética a esta doença foi encontrada (GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012). Almeida et al. (2003) observaram variabilidade genética entre os isolados brasileiros de *M. phaseolina*, o que dificultaria a obtenção de resistência à infecção radicular das cultivares comerciais de soja no Brasil. Por outro lado, a ocorrência de variedades menos sensíveis à doença vem sendo relatada por diversos estudos, entre eles, os de Mengistu et al. (2011, 2013).

O desenvolvimento de materiais resistentes a patógenos de plantas exige técnicas confiáveis de avaliação da doença e de seleção de genótipos. A maioria dos estudos que avaliam germoplasma de soja para resistência a *M. phaseolina* o fazem em campo, infestado por inoculação artificial ou com histórico da doença. No entanto, experimentos de campo podem produzir resultados inconsistentes, uma vez que diversos fatores inerentes ao patossistema podem variar entre locais e entre safras. Para minimizar essa variabilidade, ensaios sob condições controladas em casa de vegetação ou câmaras de crescimento, com padronização das condições ambientais e técnicas de inoculação são indicados.

Genótipos de soja foram testados quanto à resistência à podridão-de-carvão em ambientes controlados, em plântulas (BRISTOW; WYLLIE, 1984) ou plantas adultas (SURRETE, MEINTS; TREVATHAN, 2006; TWIZEYMANA et al., 2012). Por se tratar de um patógeno transmitido via semente, estudos de metodologias de infestação de sementes por *M. phaseolina*, para seleção de materiais resistentes foram estudados para outras culturas, como o guandu (*Cajanus cajan*) (ROSA, 2006).

Os métodos mais simples de inoculação de sementes consistem na imersão das mesmas numa suspensão de esporos (TANAKA; MENTEN, 1991) e o contato das sementes com a colônia fúngica desenvolvida em meios de cultura convencionais. A inoculação de sementes com fungos ou bactérias tem sido realizada para infestação de sementes de variadas culturas (COSTA et al., 2003; MACHADO et al., 2004; 2007; ROSA, 2006; SOUSA et al., 2008; FARIAS et al., 2010; RODRIGUES et al., 2016).

Assim, este trabalho teve por objetivo verificar a eficiência da infestação de sementes de soja pela incubação em contato com colônias de *M. phaseolina* por 48 horas, comparar dois métodos de germinação (semeadura em papel de germinação ou vasos, em casa de vegetação), e correlacionar a germinação relativa de genótipos em ambos os ambientes com a severidade de podridão-de-carvão observada em ensaio de campo realizado em Sertaneja-PR.

6.4 MATERIAL E MÉTODOS

6.4.1 Ensaio de campo

O ensaio de campo foi conduzido no município de Sertaneja-PR, (22°52'54.7"S e 50°52'50.6"W) na safra de 2015/2016, sob sistema de plantio direto sem irrigação. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com três repetições. Trinta e um genótipos de soja foram semeados em parcelas de sete linhas espaçadas a 45 cm, e 25 metros de comprimento. Na ocasião da semeadura, 40 kg/ha de inóculo produzido em sementes de sorgo foram distribuídos juntamente com as sementes de soja, nos sulcos de semeadura.

O isolado de *M. phaseolina* utilizado nos ensaios foi obtido de plantas sintomáticas provenientes da região do cerrado brasileiro. Para produção do inóculo, sementes de sorgo foram lavadas, colocadas até aproximadamente 2/5 do volume de garrafas plásticas brancas foscas de capacidade de 1 L e deixadas de molho, em água suficiente para cobrir as

sementes. No dia seguinte, foram autoclavadas por 30 minutos a 121 °C. Após o resfriamento, seis discos de micélio retirados da borda de colônias do fungo cultivado em meio batata-dextrose-ágar (BDA) a 28 °C por cinco dias, foram inoculados em cada garrafa.

As garrafas foram incubadas a 28 °C no escuro. Do terceiro dia em diante, as garrafas foram diariamente agitadas para uniformizar a colonização e evitar formação de agregados. Após aproximadamente 20 dias, os grãos estavam totalmente colonizados, apresentando coloração negra, prontos para serem utilizados no campo.

A avaliação da podridão-de-carvão ocorreu entre os estágios R5 e R6, pela observação da incidência de plantas doentes em relação ao total de plantas da parcela. Os sintomas observados foram maturação desuniforme, murcha e retenção de folhas e enchimento deficiente dos grãos. Os dados de incidência (%) foram verificados quanto à homogeneidade de normalidade dos resíduos e as médias comparadas pelo teste de Skott-Knott a 1% de probabilidade.

6.4.2 Ensaio em casa de vegetação

Os ensaios em ambiente controlado foram realizados em casa de vegetação e laboratório na estação experimental da empresa GDM *seeds*, no município de Cambé-PR. A inoculação foi realizada pela infestação das sementes utilizando-se o mesmo isolado inoculado no campo, com base em metodologia descrita por Rosa (2006) para inoculação de *M. phaseolina* em sementes de guandu. Sete cultivares utilizadas no campo foram selecionadas para os testes em ambiente controlado: BMX Elite IPRO, BMX Apolo RR, GDM 15I029, Vmax, BMX Potência RR, NA 5909 e BMX Tornado RR.

O isolado de *Macrophomina phaseolina* foi repicado para placas de Petri de 9 mm de diâmetro contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) e incubado a 28° C, por cinco dias.

As sementes de soja passaram por desinfestação superficial por imersão em solução de álcool 70% por 30 segundos, solução de hipoclorito a 1% por 60 segundos, seguida por três lavagens em água destilada esterilizada. As sementes foram então depositadas sobre papel filtro esterilizado para secagem, a temperatura ambiente. Foram preparadas 21 placas com cultura do patógeno, uma para cada repetição.

Em cada placa, sobre o micélio do fungo foram dispostas 40 sementes de soja, em camada simples, devidamente desinfestadas e secas. As placas com as sementes foram vedadas com parafilm e levemente agitadas em movimentos circulares visando

promover o contato uniforme das superfícies das sementes com o micélio. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 7 (ambiente x genótipo), com três repetições mais o controle não inoculado, que consistiu em sementes desinfestadas e secas.

As placas com as sementes foram mantidas a 25°C, fotoperíodo 12h/12h por 48 horas. Quinze sementes de cada repetição foram colocadas para germinar sob duas condições: a) rolos de papel de germinação mantidos em germinador a 25°C – as sementes foram distribuídas sobre duas folhas de papel germitest, umedecidas com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes a massa do papel não hidratado, coberto com uma terceira folha e realizado o rolo; b) vasos contendo solo e areia mantidos em casa de vegetação – as sementes foram depositadas sobre uma mistura autoclavada de solo e areia (1:3 v/v) e cobertas por uma camada de areia de aproximadamente dois centímetros e os vasos foram regados conforme necessidade. A temperatura da casa foi regulada para permanecer entre 28 e 30 °C.

As avaliações consistiram na determinação da porcentagem de germinação em relação ao controle não inoculado de cada genótipo, aos cinco e aos oito dias após a semeadura, respectivamente, para rolos e vasos. Os dados foram verificados quanto à homogeneidade e normalidade dos resíduos e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. Realizou-se, ainda, análise de correlação de Pearson entre a porcentagem de germinação sob as duas condições controladas e a severidade em condições de campo.

6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 31 genótipos (ver Apêndice B), sete foram selecionados baseados nos níveis de resistência observados em campo para serem utilizados na avaliação do método por infestação de sementes, em casa de vegetação e laboratório. A incidência de podridão-de-carvão nos sete materiais selecionados no ensaio de campo é apresentada na Tabela 6.1.

Tabela 6.1 – Incidência de podridão-de-carvão e nível de resistência/suscetibilidade de genótipos de soja em ensaio de campo realizado em Sertaneja-PR, safra 2015-2016.

Genótipos	Incidência (%)	Nível de resistência
NA 5909	56,67 a*	S
BMX Tornado RR	53,33 a	S
BMX Apolo RR	36,67 a	S
Vmax	20,00 b	MR

BMX Potência RR	16,67 b	MR
GDM15I029	10,00 c	R
BMX Elite IPRO	8,33 c	R
CV (%)	12,09	

*Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade, para dados transformados por $\ln(x)$.

É possível separar as variedades em três grupos de acordo com a sensibilidade a *M. phaseolina*. BMX Apolo, NA5909 e BMX Tornado apresentaram-se mais suscetíveis à doença, com médias de incidência de 36,67 a 56,67%, BMX Potência e Vmax apresentaram incidência intermediária (de 16,7 e 20%) e os materiais com melhor desempenho foram BMX Elite e GDM15I029, que apresentaram incidência média de 8,3 e 10%, respectivamente.

A maioria dos trabalhos para avaliar resistência à podridão-de-carvão é realizado em campos com histórico da doença. Grande parte destes trabalhos encontra diferenças entre os genótipos, como mostraram Smith e Carvil (1997) e Mengistu et al. (2011, 2013). Um dos problemas dos trabalhos realizados em campos naturalmente infestados é a falta de uniformidade na distribuição espacial do inóculo. Neste estudo, apesar da área ter histórico da doença, foi aplicado inóculo na linha de semeadura, buscando maior uniformidade de infecção e, portanto, maior confiabilidade nos resultados.

Pastor-Corrales e Abawi (1988) observaram maior severidade de podridão da raiz causada por *M. phaseolina* em plantas de feijão em condições de campo artificialmente inoculado com 4g de grãos de arroz colonizado por metro de linha, em comparação com campo naturalmente infestado.

A região de localização do ensaio de campo do presente trabalho caracteriza-se por apresentar altas temperaturas, com a máxima média chegando aos 34°C. Aliado a este fato, na safra em estudo, o local passou por uma estiagem, causando estresse hídrico nas plantas, durante os primeiros estágios de enchimento de grão, o que proporcionou o desenvolvimento de sintomas severos de podridão-de-carvão nas variedades mais suscetíveis.

Em relação aos experimentos realizados em condições controladas, os resultados da germinação relativa (percentagem de germinação das sementes inoculadas em relação à percentagem de germinação das sementes não inoculadas de cada genótipo) de sementes infestadas por *M. phaseolina*, não mostraram interação entre os fatores (ambiente de germinação e genótipos), indicando que, independentemente do método de germinação a que

são submetidos, os genótipos respondem de forma semelhante. A germinação foi significativamente maior (Tukey, $p < 0,001$) quando as sementes foram mantidas em germinador em rolos de papel de germinação embebidos em água por 5 dias do que quando semeadas em vaso. A média da germinação no rolo foi de 38,09% contra 26,52% em vasos mantidos em casa de vegetação.

A germinação em papel acaba sendo mais rápida, e, por consequência, maior, pela uniformidade de água, luz e temperatura, além do fato de não haver uma barreira física a quebrar, como acontece no solo. Como nos vasos a germinação demora mais, sementes doentes e de baixo vigor sofrem maiores danos, chegando a nem emergir.

Para estudar a eficiência dos métodos na discriminação dos genótipos quanto à suscetibilidade ao patógeno, os mesmos foram analisados separadamente (Tabela 6.2). Para a germinação em papel de germinação, Vmax apresentou-se mais resistente BMX Apolo RR e BMX Tornado RR, iguais entre si. Quando avaliada em vasos, somente foi possível diferenciar a cultivar Vmax como mais resistente que NA 5909 e BMX Tornado RR, iguais entre si.

Rosa (2006) também verificou a eficácia do método de inoculação por exposição de sementes a *M. phaseolina* e, variando períodos de exposição, verificou que 24 horas de exposição de sementes de guandu escarificadas são suficientes para detectar diferenças na resistência ao patógeno, porém, em um segundo momento, ao testar outros períodos de exposição, indicou 32 horas de exposição permitindo melhor diferenciação de genótipos entre si.

Rodrigues et al. (2016), por sua vez, inocularam *Fusarium oxysporum* em sementes de feijão, com exposição das sementes à colônia do patógeno por 48 horas, com restrição hídrica, e, ao avaliarem a emergência aos dez dias, observaram diferença com a testemunha não inoculada, porém, não houve diferença com outros métodos de inoculação que foram infestação do substrato com discos de BDA contendo micélio do patógeno e infestação das sementes por suspensão de esporos.

Quando observamos a porcentagem de germinação pelos dois métodos é possível confirmar o baixo desempenho dos genótipos mais suscetíveis, como ocorrido no campo. Assim, os métodos podem ser considerados eficientes para selecionar e descartar os materiais mais suscetíveis. O comportamento de Vmax, como a maior taxa de germinação relativa, foi inesperado, e pode ter ocorrido por alguma característica inerente à qualidade fisiológica do lote de sementes desta variedade.

Alguns autores observam que quanto maior é o nível de infecção do patógeno nas sementes, através da exposição dessas por diferentes tempos de contato com o fungo, resulta em um maior número de sementes mortas e conseqüentemente diminuição na porcentagem de germinação e emergência das plântulas, devido principalmente à morte do embrião (COSTA et al., 2003; GALLI; PANIZZI; VIEIRA, 2007; BOTELHO et al., 2013; REIS et al., 2014). No presente estudo, como não variou-se o tempo de exposição ao fungo, a menor germinação das sementes em certas cultivares, pode ter sido ocasionado pela maior suscetibilidade à doença desses genótipos para um mesmo tempo de contato e de infecção com o fungo.

Destacamos ainda, em relação a estes dados, a menor diferença de germinação entre os métodos, para os materiais suscetíveis BMX Apolo RR e BMX Tornado RR, indicando que, quando o material é muito suscetível, a infestação das sementes afeta drasticamente a capacidade de germinação das mesmas.

Tabela 6.2 – Percentagem de germinação relativa em rolo de germinação (germinador) e em vasos (casa de vegetação) de sementes previamente inoculadas com *Macrophomina phaseolina*.

Genótipos	% germinação relativa corrigida	
	Rolo de germinação	Vaso em casa de vegetação
Vmax	74,07 a ¹	58,97 a
GDM 15I029	64,44 ab	48,89 ab
BMX Potência RR	51,51 ab	21,43 ab
BMX Elite IPRO	42,1 ab	35,56 ab
NA 5909	22,22 abc	7,14 b
BMX Apolo RR	7,84 c	8,89 ab
BMX Tornado	4,44 c	4,76 b
Média	38,09	26,52
CV (%)	40,74	69,75

¹médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 1% de probabilidade.

A correspondência do desempenho dos genótipos em condições de campo e em ambiente controlado fica evidente quando realizamos a análise de correlação entre as mesmas (Tabela 6.3). Para ambos os ambientes em que foram avaliadas as germinações relativas, houve correlação negativa significativa com a severidade observada no campo. As correlações negativas querem dizer que as grandezas são inversamente proporcionais, ou seja,

quanto maior a severidade no campo, menor a percentagem de germinação relativa, tanto em germinador como em casa de vegetação.

Os valores de correlação foram altos e muito próximos entre si (77,5% em germinador e 77,9% em casa de vegetação), podendo, ambos, serem usados para seleção de genótipos de soja resistentes à *M. phaseolina* em ambiente controlado. No entanto, levando em conta a praticidade, economia de espaço, material e mão de obra, além da menor variação ambiental, indicamos a metodologia da germinação em rolos de papel de sementes infestadas com *M. phaseolina* como a mais adequada para seleção de genótipos resistentes à podridão-de-carvão.

Tabela 6.3 – Coeficiente de correlação (r) e p-valor de correlações de Pearson entre dados de percentagem de germinação relativa em rolo de papel ou em vasos em casa de vegetação de sementes infestadas com *Macrophomina phaseolina* com dados de severidade de podridão-de-carvão em ensaio de campo realizado em Sertaneja-PR.

Método de germinação	Correlação de Pearson	
	r	p-valor
Rolo de papel em germinador	-0,775	0,04063
Vaso em casa de vegetação	-0,779	0,03909

Trabalhos precedentes a este, realizado pelos mesmos autores, também encontraram correlação positiva entre severidade de podridão-de-carvão em ambiente controlado após inoculação com *M. phaseolina* pelo método do disco de micélio em ponteira sobre a haste cortada e a severidade observada em ensaio de campo, sob câmara úmida ou não, após inoculação ($r_s = 0,84$ e $r_s = 0,80$, respectivamente) (ISHIKAWA et al., 2018).

6.6 CONCLUSÕES

Os métodos de inoculação de sementes de soja por contato com colônia de *M. phaseolina* por 48 horas seguidos por: a) avaliação da percentagem de germinação relativa, após 5 dias da semeadura em rolo de papel de germinação, em germinador e b) avaliação da germinação aos 8 dias após semeadura em vasos em casa de vegetação, são eficientes para discriminação dos genótipos quanto à resistência a podridão-de-carvão;

A germinação, em ambos os métodos, apresentou alta correlação negativa com a severidade de podridão-de-carvão observada em campo. Indica-se o método da

semeadura em papel de germinação pela praticidade, economia de espaço, material e mão de obra, além do melhor controle das condições a que são submetidas as sementes.

7. CONCLUSÕES GERAIS

Em relação às metodologias de inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum*, podemos concluir que:

- a melhor época de inoculação e avaliação de *S. sclerotiorum* varia para cada método utilizado, principalmente devido à idade e local da planta a ser inoculado;
- condições de câmara úmida após a inoculação não se fazem necessárias para infecção das plantas, nos métodos estudados, e, inclusive, a ausência de câmara úmida após a inoculação proporcionou maior correlação entre a severidade entre ambiente controlado e campo;
- dentre os métodos e variações estudados, o do disco de micélio em ponteira sobre a haste cortada (42 dias após a semeadura, na ausência de câmara úmida e avaliação aos 12 dias após a inoculação) é o mais indicado para seleção de genótipos de soja resistentes ao mofo-branco, por apresentar melhor repetibilidade e maior correlação com dados de severidade em ensaios de campo naturalmente infestados;
- os isolados de *S. sclerotiorum* variam em agressividade segundo o genótipo de soja e o método de inoculação utilizado; o nível de agressividade é dependente da interação entre os fatores envolvidos (genótipo e isolado) em questão;

A respeito da inoculação de sementes de soja por contato com colônias de *Macrophomina phaseolina* por 48 horas, ambos os métodos de germinação (em rolo de papel ou substrato em vasos) são eficientes para discriminação dos genótipos quanto à resistência a podridão-de-carvão, apontando alta correlação negativa com a severidade da doença observada em campo. Indica-se, portanto, o método da semeadura em papel de germinação pela praticidade, economia de espaço, material e mão de obra, além do melhor controle das condições a que são submetidas as sementes.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, M.T. et al. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, v.27, p.1354-1359, 2008.
- ABREU, M. J. de. **Caracterização de isolados do agente causal do mofo branco do feijoeiro**. 2011. 73 p. Dissertação (Mestrado em genética e melhoramento de plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
- ADAMS, P. B.; AYERS, W. A. Ecology of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, Lancaster. Vol. 69 (8): 896-899. 1979.
- AUCLAIR, J. et al. Genetic interactions between *Glycine max* and *Sclerotinia sclerotiorum* using a straw inoculation method. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 891-895, Aug. 2004a.
- AUCLAIR, J. et al. Development of a new field inoculation technique to assess partial resistance in soybean to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.84, p.57-64, 2004b.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4ed. John Wiley & Sons, New York, NY, USA, 1996. 868 p.
- ALMEIDA, A. M. R. et al. **Macrophomina phaseolina em soja: sistema de semeadura, sobrevivência em restos cultura e diversidade genética**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 47 p.
- ALMEIDA, A. M. R. et al. Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p.279-285, 2003.
- ALMEIDA, A. M. R., et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, cap. 64, 2005, p. 569-588.
- ALMEIDA, L. A.; KIIHL, R. A. S. **Melhoramento de soja no Brasil – Desafios e perspectivas**. In: CÂMARA, G. M. S. (Ed.). Soja, tecnologia da produção. Piracicaba, SP: Publique, 1998. p. 40-54.
- ALVARENGA, D. O., et al. **Aspectos relacionados ao controle biológico do mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007, 24 p.
- ANDRADE, G. C. G. **Reações de genótipos de soja ao mofo branco**. 2015. 74 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia (EA), Goiânia, 2015.
- ANDRUS, C. F. Seed transmission of *Macrophomina phaseoli*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 28, p. 620-643, 1938.

- ARAHANA, V. S., et al. Identification of QTLs for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Crop Science** 41: 180-188. 2001.
- BARDIN, S.D.; HUANG, H.C. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canadá. **Canadian Journal Plant Pathology**, Ottawa, v. 23, p. 88-98, 2001.
- BLACK, R. J. Complexo soja: fundamentos, situação atual e perspectiva. In: CÂMARA, G. M. S. (Ed.). **Soja: tecnologia de produção II**. Piracicaba, SP: ESALQ, 2000. p. 1- 18.
- BOLAND, G.; HALL, R. Evaluating soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* under field conditions. **Plant Disease**, v. 71, p. 934-936, 1987.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plants of hostes *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal Plant Pathology**, Ottawa, v. 16, n. 1, p. 93–108, 1994.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.
- BOTELHO, L. S. et al. Performance of common bean seeds infected by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of seed Science**, Brasília, v. 35, n. 2, p. 153-160, 2013.
- BRIDLE, P.; TIMBERLAKE, C.F. Anthocyanins as natural food colours – selected aspects. **Food Chemistry**, v.58, n.1-2, p.103-109, 1997.
- BRISTOW, W. E.; WYLLIE, T. Reaction of soybean cultivars to *Macrophomina phaseolina* as seedlings in the growth chamber and field. **Transactions of the Missouri Academy of Science**, Missouri, v. 19, p. 5-10, 1984.
- BUENO, C. J; FISCHER, I. H. Manejo de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 3, n. 2, Jul-Dez 2006.
- CAMARGO, M. P. ***Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja: sobrevivência, efeito na germinação, tamanho de amostra para análise e eficiência in vitro de fungicidas**. 77 f. Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2013.
- CANTERI, M. G.; DALLA PRIA, M.; SILVA, O. C. **Principais doenças fúngicas do feijoeiro: orientações para manejo econômico e ecológico**. Ponta Grossa: UEPG. 1999. 178 p.
- CASSETARI NETO, D.; MACHADO, A. Q.; SILVA, R. A. **Manual de doenças da soja**. São Paulo: Cheminova Brasil LTDA, 2010. 57 p.
- CHAVES, M. S.; MARTINELLI, J. A.; LOCH, L. C. Uso de micélio seco de *Sclerotinia sclerotiorum* como método de inoculação e avaliação da resistência de cultivares de soja. **Summa Phytopathologica**, v. 22, p. 221-224, 1996.
- CHRISTIAS, C.; LOCKWOOD, J.L. Conversion of mycelial constituents in four sclerotium-forming fungi in nutrient deprived conditions. **Phytopathology**, Lancaster, v. 63, p. 602-605, 1973.

CHUN, D.; KAO, B.; LOCKWOOD, J. L. Laboratory and field assessment of resistance in soybean to stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 71, p. 811-815, 1987.

CLAUDINO, M. R. **Métodos de inoculação de *Macrophomina phaseolina* em mamoneira visando à seleção de genótipos resistentes**. 2013. 30 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba.

CLINE, M. N.; JACOBSEN, B. J. Methods for evaluating soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 67, n. 7, July, 1983.

CLOUD, G. L.; RUPE, J. C. Influence of nitrogen, plant growth stage, and environment on charcoal rot of grain sorghum caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 158, p. 203-210, 1994.

COELHO NETO, R. A. **Metodologia e avaliação da resistência de feijoeiro à podridão cinzenta do caule, em laboratório e casa-de-vegetação**. 1994. 54 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em < http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_09_12_10_14_36_boletim_graos_s_tembre_2017.pdf > Acesso em fev/2018.

COSTA, M. L. N. et al. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, p. 1023-1030, 2003.

CRATO, F. F. **Quantificação de escleródios e germinação miceliogênica e carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* oriundos da cultura da soja tratada química e biologicamente**. 2013. 72 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Uberlândia.

DALL'AGNOL, A. et al. **O complexo agroindustrial da soja brasileira**. Londrina: Embrapa Soja, 2007, 5 p. (Circular Técnica 43).

DHINGRA, O. D.; MENDONÇA, H. L.; MACEDO, D. M. Doenças e seu controle. In: SEDIYAMA, T. (Ed.). **Tecnologias de produção e usos da soja**. 1.ed. Londrina: Mecenas, 2009. p.133-155.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina***. Viçosa: UFV, 1978. 166p.

DORRANCE, A. E.; MILLS, D. Sclerotinia stem rot (white mold) of soybean. The Ohio State University, 2008. Disponível em: <https://ohioline.osu.edu/factsheet/plpath-soy-3>.

DUTTON, M. V.; EVANS, C. S. Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the environment. **Canadian Journal of Microbiology**. v.42, p.881-895, 1996.

EKINS, M. et al. Population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* on sunflower in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v.40, p.99-108, 2011.

EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de produção de soja**: região central do Brasil 2004. Londrina: Embrapa Soja, 2003. 237 p. (Sistemas de Produção 4)

ESKER, P. et al. **Management of white mold in soybean**. North Central Soybean Research Program, 2011.

FARIAS, C. R. J. et al. Infecção de sementes de trigo com *Bipolaris sorokiniana* pela técnica de restrição hídrica. **Tropical plant pathology**, Brasília, v. 35, n. 4, 2010.

FARIAS NETO, A. L. et al. **Podridão-vermelha-da-raiz e mofo branco na cultura da soja**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2008. 27 p.

FEHR, W. R. et al. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merr. **Crop Science**, v. 11, p. 929-931, 1971.

FERRAZ, L. C. L. et al. Viabilidade de *Sclerotinia sclerotiorum* após a solarização do solo na presença de cobertura morta. **Fitopatologia brasileira**. v.28, n.1, 2003.

FURLAN, S. H. **Guia de identificação de doenças do feijoeiro**. Campinas: Instituto Biológico. 109 p, 2012.

GAETÁN, S. A.; FERNANDEZ, L.; MADIA, M. Occurrence of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on canola in Argentina. **Plant Disease**, v. 90, p. 524, 2006.

GALLI, J. A; PANIZZI, R. C.; VIEIRA, R. D. Resistência de variedades de soja à morte de plântulas causada por *Colletotrichum truncatum*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 2, p. 163-165, 2007.

GARCIA, R. **Produção de inóculo, efeito de extratos vegetais e de fungicidas e reação de genótipos de soja à *Sclerotinia sclerotiorum***. 2008. 154 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

GARCIA, R. C. et al. Métodos de inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* para triagem de cultivares de soja resistentes ao mofo branco. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.50, n.8, p.726-729, ago. 2015.

GARCIA, R. A.; JULIATTI, F. C. Avaliação da resistência da soja a *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes estádios fenológicos e períodos de exposição ao inóculo. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, p. 196-203, 2012.

GOMES, E. V. et al. Microsatellite markers reveal genetic variation within *Sclerotinia sclerotiorum* populations in irrigated dry bean crops in Brazil. **Journal of Phytopathology**, v.159, p.94-99, 2011.

GONÇALVES, P. R.; SANTOS, J. B. Physiological resistance of common bean cultivars and lines to white mold based on oxalic acid reaction. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 53, p. 236-237, 2010.

GÖRGEN, C. A. **Manejo do mofo branco da soja com palhada de *Brachiaria ruziziensis* e *Trichoderma harzianum*** 72 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Campus Jataí, 2009.

GRAU, C.R. **Sclerotinia stem rot**. In: Compendium of soybean diseases. St. Paul, APS Press. p. 47-48. 1989.

GRAU, C.; HARTMAN, G. **Sclerotinia stem rot**. 4th ed. St. Paul: APS Press, 1999. p.46-48. (Compendium of soybean diseases).

GRIGOLLI, J. F. J. **Manejo de doenças na cultura da soja**. Tecnologia e Produção: Soja 2014/2015. Fundação MS. 2015.

GUPTA, G. K.; SHARMA, S. K.; RAMTEKE, R. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Journal of Phytopathology**, Oxford, v.160, n.4, p.167-180, 2012.

HARBORNE, J. B.; GRAYER, R. J., The anthocyanins. In: **The flavonoids: advances in research since 1980**. Chapman & Hall, London, 1988, p. 1-20.

HAREL, A.; BERCOVICH, S.; YARDEN, O. Calcineurin is Required for Sclerotial Development and Pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* in an Oxalic Acid–Independent Manner. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, p. 682-693, 2006.

HENNEBERG, L. et al. Efficiency of methods to detect *Sclerotinia sclerotiorum* in commercial soybean seed lots. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 763-768, 2012.

HENSON, J. M.; BUTLER, M. J.; DAY, A. W. The dark side of mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 447–471, 1999.

HILDEBRAND, A. A. An elaboration of toothpick method of inoculating plants. **Canadian Journal of Agricultural Science**. v. 33, n.4, p. 596-598, 1953.

HJELJORD, L.; TRONSMO, A. Trichoderma and Gliocladium in biological control: an overview. In: HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. **Trichoderma and Gliocladium: enzymes, biological control and commercial applications**. Londres: Taylor & Francis, 2005, p.115-133.

HOFFMAN, D. D., et al. Selected soybean plant introductions with partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v.86, p.971-980, 2002.

HOMECHIN, M. **Determinação de perdas da produção de soja, devido a incidência do fungo *Sclerotinia sclerotiorum***. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 15., 1982, São Paulo. Resumos... São Paulo: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1982. p. 476.

HUANG, H.; ERICKSON, R. S. Factors affecting biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by fungal antagonists. **Journal of Phytopathology**, v.156, p.628-634, 2008.

- HÜLLER, G. C., et al. Different methods of assessing susceptibility of soybean genotypes to white mold. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 32, n. 2, p. 389-402, Mar./Apr. 2016.
- HUNTER, J. E., et al. Relationship between soil moisture and occurrence of *Sclerotinia sclerotiorum* and white mold disease on snap beans. **Protection Ecology**, n.7, p.269-280, 1984.
- ISHIKAWA, M. S., et al. Seleção de cultivares de soja para resistência à podridão negra da raiz (*Macrophomina phaseolina*). **Summa Pthytopathologica**, Botucatu, v. 44, n. 1, p. 38-44, 2018.
- JACCOUD FILHO D. S. et al. Strategies to management and control of the white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) in soybean crops. **Tropical Plant Pathology**, v. 39 (Supplement), p. 15-17, 2014.
- JONES, J. B.; JONES, J.P.; STALL, R. E.; ZITTER, T. A. (ED.). **Compendium of tomato diseases**. St. Paul: APS, 1991.
- JULIATTI, F. C., et al. **Doenças da Soja**. Uberlândia: UFU, 2003, 13 p. (Caderno Técnico Cultivar, n. 47).
- JULIATTI, F. C. et al. Métodos de inoculação e avaliação da resistência de genótipos de soja à *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 4, p. 958-968, 2014.
- JULIATTI, F.; POLIZEL, A. C.; JULIATTI, F. C. **Manejo integrado de doenças na cultura da soja**. Uberlândia: Composer, 2004, 327 p.
- KARL, A. C. 1997. **Mofa branco, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, em feijoeiro irrigado**: estudos epidemiológicos, comparação de sistemas de cultivo e de cultivares. 117 p. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Brasília, Distrito Federal. 1997.
- KATAN, J. et al. Solar heating by polyethylene mulching for the control of disease caused by soilborne pathogens. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 66, p. 683-688, 1976.
- KAUR, S. et al. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. **Critical Reviews in Mycobiology**, v.38, p.136-151, 2012.
- KENDIG, S. R.; RUPE, J. C.; SCOTT, H. D. Effect of irrigation and soil water stress on densities of *Macrophomina phaseolina* in soil and roots of two soybean cultivars. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, p. 895-900, 2000.
- KHAN, S. N. *Macrophomina phaseolina* como agente causal de podridão de carvão em girassol. **Mycopathology**, v 5, p. 111-118, 2007.
- KIM, H. S.; DIERS, B. W. Inheritance of partial resistance to *Sclerotinia* stem rot in soybean. **Crop Science**, v. 40, p. 55-61, 2000.
- KIM, H. et al. Reaction of soybean cultivars to *Sclerotinia* stem rot in field, greenhouse, and laboratory evaluations. **Crop Science**, v.40, p.665-669, 2000.

KIM, K. S.; DICKMAN, M. B.; MIN, J. Y. Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, p. 605-612, 2008.

KIMATI, Y.; BERGAMIN FILHO, A. Princípios gerais de controle. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. eds. **Manual de Fitopatologia**. Volume 1 - Princípios e Conceitos. 4ª Edição. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo. 2011. 704p.

KOGA, L. J. et al. Mycelial compatibility and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Brazil and the United States. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 4, p. 265-272, abr. 2014.

KOHLI, Y. et al. Clonal dispersal and spatial mixing in populations of the plant pathogenic fungus, *Sclerotinia sclerotiorum*. **Molecular Ecology**, v.4, p.69-77, 1995.

KOHN, L. et al. Mycelial incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, v.81, p.480-485, 1991.

KULL, L.S. et al. Evaluation of resistance screening methods for *Sclerotinia* stem rot of soybean and dry bean. **Plant Disease**, Saint Paul, v.87, p.1471-1476, 2003.

KULL, L.S. et al. Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 325-332, 2004.

KURLE, J. E. et al. Tillage, crop sequence, and cultivar effects on *Sclerotinia* stem rot incidence and yield in soybean. **Agronomy Journal**, v. 93, n. 5, p. 973-982, 2001.

LEHNER, M. S. et al. Meta-analytic modeling of the incidence-yield and incidence-sclerotial production relationship in soybean White mold epidemics. **Plant Pathology**, v. 66, n. 3, p. 460-468, Oxford, 2017.

LEITE, R. M. V. B. C. **Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja**. Londrina: Embrapa Soja, 3 p. (Comunicado Técnico 76), 2005.

LEITE, M. E. **Seleção recorrente em feijoeiro visando a resistência à *Sclerotinia sclerotiorum* e respostas bioquímicas associadas à defesa contra o patógeno**. 2014. 153 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)–Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

LIANG, X. et al. Oxaloacetate acetylhydrolase gene mutants of *Sclerotinia sclerotiorum* do not accumulate oxalic acid, but do produce limited lesions on host plants. **Molecular Plant Biology**, v. 16, n. 6, p. 559-571, 2015.

LITHOLDO JÚNIOR, C. G. et al. Genetic diversity and mycelial compatibility groups of the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, p. 868-877, 2011.

LOPES, T. J. et al. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Revista Brasileira Agrociência**, v.13, n.3, p.291-297, 2007.

MACHADO, C. C. **Esporulação de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. e viabilidade do método de inoculação de esporos em estudos de seleção de germoplasma resistente.** 1980. 75 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1980.

MACHADO, J. C. et al. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, p. 62-67, 2004.

MACHADO, A. Q. et al. Potencial do uso da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes de algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 408-414, 2007.

MACHADO, C. C., KIMATI, H. Effect of light on pycnidia formation by *Macrophomina phaseolina* in culture media. **Summa Phytopathologica**, v.1, p. 65-66, 1975.

MARCIANO, P.; DI LENNA, P.; MAGRO, P. Oxalic acid, cell wall-degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower. **Physiological Plant Pathology**, v.22, p.339-345, 1983.

MARINGONI, A. C.; LAURETTI, R. L. B. Reação de genótipos de feijoeiro comum a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *Macrophomina phaseolina* e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 4, p. 535-542, 1999.

MAXWELL, D. P.; LUMSDEN, R. D. Oxalic acid production by *Sclerotinia sclerotiorum* in infected bean and in culture. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, p. 1395-1398, 1970.

MEDEIROS, A. C. et al. Métodos de inoculação de *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina* em meloeiro (*Cucumis melo*). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 41, n. 4, p. 281-286, 2015.

MENGISTU, A. et al. Evaluation of soybean genotypes for resistance to charcoal rot. Online. **Plant Health Progress**, Saint Paul, 2011.

MENGISTU, A. et al. Identification of soybean accessions resistant to *Macrophomina phaseolina* by field screening and laboratory validation. Online. **Plant Health Progress**, Saint Paul, 2013.

MENTEN, J. O. et al. Evolução dos produtos fitossanitários para tratamento de sementes no Brasil. IN: ZAMBOLIM, L. **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV, DFP, 2005, cap. 12, p. 333-374.

MIHAIL, J. D.; ALCORN, S. M. *Macrophomina phaseolina*: spatial patterns in a cultivated soil and sampling strategies. **Phytopathology**, v. 77, p. 1126-1131, 1987.

MIKLAS, P. N.; GRAFTON, K. F.; NELSON, B. D. Screening for partial physiological resistance to white mold in dry bean using excised stems. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 117, n. 2, p. 321-327, 1992.

- MIKLAS, P.N.; DELORME, R.; RILEY, R. Identification of QTL conditioning resistance to white mold in snap bean. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.128, p.564-570, 2003.
- MUCHERO, W. et al. Genic SNP markers and legume synteny reveal candidate genes underlying QTL for *Macrophomina phaseolina* resistance and maturity in cowpea [*Vigna unguiculata* (L) Walp.]. **BMC Genomics**, v. 12, p. 8, 2011.
- MUELLER, D. S. et al. Application of thiophanate-methyl at different host growth stages for management of sclerotinia stem rot in soybean. **Crop Protection**. v.23, n. 10, p. 983-988, 2004.
- NDIAYE, M. **Ecology and management of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) on cowpea in the Sahel**. 2007. 114f. PhD Thesis Wageningen University, the Netherlands. 2007.
- NELSON, B. D.; HELMS, T. C.; KURAL, I. Effects of temperature and pathogen isolate on laboratory screening of soybean for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.71, p. 347-352, 1991.
- OTTO-HANSON, L. et al. Variation in *Sclerotinia sclerotiorum* bean isolates from multisite resistance screening locations. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, n. 11, p. 1370-1377, nov. 2011.
- PARIUAD, B. et al. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. **Plant Pathology**, Honolulu, v.58, n. 3, p. 409-424, june 2009.
- PASTOR-CORRALES, M. A.; ABAWI, G. S. Reactions of selected beans accessions to infection by *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 72, n. 1, p. 39-41, 1988.
- PAULA JUNIOR, T. J. et al. **Manejo integrado do mofo branco do feijoeiro**. Viçosa: EPAMIG/CTZM, 2006, 46p. Guia técnico.
- PAULA JÚNIOR, T. J. et al. Mofo branco. In: PRIA, M.D.; SILVA, O.C. **Cultura do feijão: doenças e controle**. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2010. cap. 6 e 7.
- PELTIER, A. J., et al. Biology, yield loss and control of *Sclerotinia* stem rot of soybean. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 3, n. 2, p. 1-7, 2012.
- PENARIOL, A. Soja: **Cultivares no lugar certo**. Informações Agronômicas 90:13-14. 2000. Disponível em [http://www.ipni.net/PUBLICATION/IA-BRASIL.NSF/0/3D7AD150106A80E683257AA30069BE0F/\\$FILE/pages13-14-90.pdf](http://www.ipni.net/PUBLICATION/IA-BRASIL.NSF/0/3D7AD150106A80E683257AA30069BE0F/$FILE/pages13-14-90.pdf)
- PRATT, R. G.; ROWE, D. E. Differential responses of alfalfa genotypes to stem inoculations with *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. trifoliorum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, p. 188-191, 1991.
- PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. **Phytopathology** 69, 875–880. 1979.

- REIS, E. M. et al. Indução da germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes substratos. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 10, n. 2, 2011.
- REIS, G. F. et al. Viabilidade de armazenamento de sementes de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* em meio com restrição hídrica. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 40, n. 2, p. 168-173, 2014. doi:10.1590/0100-5405/1908
- RODRIGUES, G. F. et al. Inoculação artificial de *Fusarium oxysporum* em sementes de *Phaseolus vulgaris*. **Scientia Plena**, Aracaju, v. 12, n. 7, 2016.
- ROSA, J. **Seleção de genótipos de guandu para resistência a *Macrophomina phaseolina* e esporulação do fungo**. 2006. 60 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Produção vegetal) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.
- ROUSSEAU, G., et al. Greenhouse and field assessments of resistance in soybean inoculated with sclerotia, mycelium, and ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Disease**. p. 615-623. April, 2004.
- SANTOS, A. F.; ATHAYDE, J. T.; DAN, E. L. Microflora associada às sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) no Estado do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 9, n. 3, p. 379, 1984.
- SCHWARTZ, H. F.; SINGH, S. P. Breeding common bean for resistance to white mold: a review. **Crop Science**, v. 53, p. 1832-1844, 2013.
- SCHMITTHENNER, A. F.; BHAT, R. G. **Useful methods for studying *Phytophthora* in the laboratory**. Wooster: Ohio Agricultural Research and Development Center, 1994. (Special Circular, 143). 10 p.
- SHORT, G. E.; WYLLIE, T. D.; AMMON, V. D. Quantitative enumeration of *Macrophomina phaseolina* in soybean tissues. **Phytopathology**, v. 68, p. 736–741, 1978.
- SINCLAIR, J.B.; BECKMAN, P. A. **Compendium of soybean disease**. 3 ed. St. Paul: APS Press, 1989. 106 p
- SMITH, G. S.; CARVIL, O. N. Field screening of commercial and experimental soybean cultivars for their reaction to *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 4, p. 363-368, 1997.
- SOUSA, M. V. et al. Métodos de inoculação e efeitos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro. **Tropical plant pathology**, Brasília, v. 33, n. 1, 2008.
- STEADMAN, J.R. White mold- a serious yield-limiting disease of bean. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, n. 4, p. 346-350, 1983.
- SU, G. et al. Host specialization in the charcoal rot fungus *Macrophomina phaseolina*. **Phytopathology**, v. 91, p. 120-126, 2001.

SURRETTE, S. B.; MEINTS, P. D.; TREVATHAN, L. E. Evaluation of two methods to infect soybean with *Macrophomina phaseolina* (Deuteromycota) under controlled environmental conditions. **Journal of the Mississippi Academy of Sciences**, Mississippi, v. 51, p. 134-139, 2006.

TANAKA, M. A. S.; MENTEN, J. O. M. Comparação de métodos de inoculação de sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii*. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 17, p. 218-226, 1991.

TERÁN, H.; SINGH, S. P. Gamete selection for improving physiological resistance to White mold in common beans. **Euphytica**, Wageningen, v. 25, n. 1, p. 271-280, jan. 2009.

TOLÊDO-SOUZA, E. D.; COSTA, J. L. S. Métodos de inoculação de plântulas de feijoeiro para avaliação de germoplasma quanto a resistência a *Sclerotinia sclerotiorum* (lib.) de Bary. **Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)**, v. 33, n. 2, p. 57-63, 2003.

TWIZEYIMANA, M. et al. A cut-stem inoculation technique to evaluate soybean for resistance to *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, p. 1210-1215, 2012.

VIANA, F. M. P. **Influência de fatores físicos e de material orgânico na germinação de microescleródios de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goindanich**. 1996. 100f. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas. Botucatu. 1996.

VIDIC, M. et al. Review of soybean resistance to pathogens. **Field and Vegetable Crops Research**, Sérvia, v. 50, n. 2, p. 5261, 2013.

VIEIRA, R. **O mofo branco do feijoeiro** - Feijão no inverno, Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 17, n. 178, p. 54-63, 1994.

VIEIRA, R.F.; PAULA T.J.; PERES, A.P. MACHADO, J.C. Fungicidas aplicados via água de irrigação no controle do mofo-branco no feijoeiro e incidência do patógeno na semente. **Fitopatologia Brasileira**. vol. 26 n. 4, 2001.

VINHOLES, P. S. **Associação genômica para resistência da soja a *Meloidogyne javanica* e *Macrophomina phaseolina***. 2014. 115f. Tese (doutorado em fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

VUONG, T. D.; HARTMAN, G. L. Evaluation of soybean resistance to *Sclerotinia* stem rot using reciprocal grafting. **Plant Disease**, v. 87, p.154-158, 2003.

VUONG, T. D., et al. Evaluation of soybean, dry bean, and sunflower for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Crop Science**, v.44, p.777-783, 2004.

WALZ, A. et al. Reactive oxygen intermediates and oxalic acid in the pathogenesis of the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 120, p. 317-330, 2008.

WEGULO, S. N.; YANG, X. B.; MARTINSON, C. A. Soybean cultivar responses to *Sclerotinia sclerotiorum* in field and controlled environmental studies. **Plant Disease**. 1998. 82:1264-1270.

WHEELER, T. et al. (Eds.). **Soilborne diseases Encyclopedia of Plant Pathology**, vol. 2, Wiley, New York, p. 935-947, 2001.

WINKLER, H. E.; HETRICK, B. A. D.; TODD, T. C. Interactions of *Heterodera glycines*, *Macrophomina phaseolina*, and mycorrhizal fungi on soybean in Kansas. **Journal of Nematology**, v. 26, p. 675-682, 1994.

YANG, X. B.; LUNDEEN, P.; UPHOFF, M. D. Soybean varietal response and yield loss caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 456-461, 1999.

YORINORI, J.T. Soja. In: VALE, F.X.R. do; ZAMBOLIM, L. **Controle de Doenças de Plantas**. Viçosa: UFV, 973p. 1997.

ZIMMER, D. E.; HOES, J. A. **Diseases**. In: Sunflower science and technology (Ed. by Carter, J.F.), American Society of Agronomy, Madison, USA pp. 225-262, 1978.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Correlações de Spearman entre incidência ou severidade de mofo-branco em plantas de soja inoculadas por diversos métodos em casa de vegetação, e resultados de severidade em condições de campo naturalmente infestados.

Método	Correlação de Spearman		
	rs		p-valor
Resposta ao ácido oxálico - descoloração da haste			
Plantas 17 DAS ¹ , ácido oxálico 20mM	0,590	** ¹	0,006
Plantas 17 DAS, ácido oxálico 40mM	-0,244	ns	0,299
Plantas 30 DAS, ácido oxálico 20mM	-0,327	ns	0,159
Plantas 30 DAS, ácido oxálico 40mM	-0,458	*	0,042
Plantas 45 DAS, ácido oxálico 20mM	0,422	ns	0,064
Plantas 45 DAS, ácido oxálico 40mM	0,043	ns	0,858
Punção da haste com palito colonizado (14 DAS)			
Ausência de câmara úmida, incidência aos 2 DAI ²	0,361	ns	0,118
Ausência de câmara úmida, incidência aos 4 DAI	0,506	*	0,023
Ausência de câmara úmida, AACPDN ³ da incidência até os 4 DAI	0,244	ns	0,299
Ausência de câmara úmida, incidência aos 5 DAI	0,620	**	0,004
Ausência de câmara úmida, AACPDN da incidência até os 5 DAI	0,348	ns	0,132
Ausência de câmara úmida, incidência aos 6 DAI	0,620	**	0,004
Ausência de câmara úmida, AACPDN da incidência até os 6 DAI	0,348	ns	0,132
24 horas de câmara úmida, incidência aos 2 DAI	-0,495	*	0,026
24 horas de câmara úmida, incidência aos 3 DAI	-0,636	**	0,003
24 horas de câmara úmida, incidência aos 4 DAI	-0,746	**	0,000
24 horas de câmara úmida, AACPDN da incidência até os 4 DAI	-0,495	*	0,026
24 horas de câmara úmida, incidência aos 5 DAI	-0,590	**	0,006
24 horas de câmara úmida, AACPDN da incidência até os 5 DAI	-0,495	*	0,026
24 horas de câmara úmida, incidência aos 6 DAI	-0,590	**	0,006
24 horas de câmara úmida, AACPDN da incidência até os 6 DAI	-0,495	*	0,026
72 horas de câmara úmida, incidência aos 1 DAI	-0,584	**	0,007
72 horas de câmara úmida, AACPDN da incidência até os 2 DAI	-0,584	**	0,007
Câmara úmida constante, incidência aos 1 DAI	-0,575	**	0,008
Câmara úmida constante, incidência aos 2 DAI	-0,235	ns	0,318
Câmara úmida constante, AACPDN da incidência aos 2 DAI	-0,575	**	0,008
Câmara úmida constante, AACPDN da incidência aos 4 DAI	-0,575	**	0,008
Ferimento da haste (14 DAS)			
24 horas de câmara umida, incidência aos 2 DAI	-0,312	ns	0,181

24 horas de câmara úmida, incidência aos 3 DAI	-0,480	*	0,032
24 horas de câmara úmida, AACPDN da incidência até os 3 DAI	-0,318	ns	0,172
24 horas de câmara úmida, incidência aos 4 DAI	-0,605	**	0,005
24 horas de câmara úmida, AACPDN da incidência até os 4 DAI	-0,367	ns	0,112
72 horas de câmara úmida, incidência aos 1 DAI	-0,430	ns	0,059
72 horas de câmara úmida, incidência aos 2 DAI	-0,412	ns	0,071
72 horas de câmara úmida, AACPDN da incidência até os 4 DAI	-0,430	ns	0,059
Câmara úmida constante, incidência aos 1 DAI	0,447	*	0,048
Câmara úmida constante, incidência aos 2 DAI	0,009	ns	0,971
Câmara úmida constante, AACPDN da incidência até os 4 DAI	0,410	ns	0,073

Micélio na axila das folhas (42 DAS)	rs		p-valor
72 horas de câmara úmida, incidência aos 8 DAI	0,157	ns	0,509
72 horas de câmara úmida, incidência aos 10 DAI	0,009	ns	0,969
72 horas de câmara úmida, incidência aos 12 DAI	-0,024	ns	0,919
72 horas de câmara úmida, AACPDN até os 12 DAI	0,009	ns	0,969
72 horas de câmara úmida, incidência aos 14 DAI	0,040	ns	0,867
72 horas de câmara úmida, AACPDN até os 14 DAI	0,009	ns	0,969
Câmara úmida constante, incidência aos 8 DAI	-0,446	*	0,049
Câmara úmida constante, incidência aos 10 DAI	-0,147	ns	0,538
Câmara úmida constante, incidência aos 12 DAI	-0,575	**	0,008
Câmara úmida constante, AACPDN da incidência até os 12 DAI	-0,446	*	0,049
Câmara úmida constante, incidência aos 14 DAI	-0,575	**	0,008
Câmara úmida constante, AACPDN da incidência até os 14 DAI	-0,578	**	0,008

Disco de micélio em ponteira sobre a haste cortada (42 DAS)	rs		p-valor
Ausência de câmara úmida, severidade aos 7 DAI	-0,031	ns	0,898
Ausência de câmara úmida, severidade aos 8 DAI	0,101	ns	0,672
Ausência de câmara úmida, AACPDN da severidade até os 8 DAI	-0,324	ns	0,164
Ausência de câmara úmida, severidade aos 10 DAI	0,122	ns	0,608
Ausência de câmara úmida, AACPDN da severidade até os 10 DAI	-0,031	ns	0,898
Ausência de câmara úmida, severidade aos 12 DAI	0,602	**	0,005
Ausência de câmara úmida, AACPDN da severidade até os 12 DAI	0,101	ns	0,672
72 horas de câmara úmida, severidade aos 7 DAI	-0,458	*	0,042
72 horas de câmara úmida, severidade aos 8 DAI	-0,452	*	0,045
72 horas de câmara úmida, AACPDN da severidade até os 8 DAI	-0,452	*	0,045
72 horas de câmara úmida, severidade aos 10 DAI	0,474	*	0,035
72 horas de câmara úmida, AACPDN da severidade até os 10 DAI	-0,458	*	0,042

72 horas de câmara úmida, severidade aos 12 DAI	-0,486	*	0,030
72 horas de câmara úmida, AACPDN da severidade até os 12 DAI	-0,486	*	0,030
Câmara úmida constante, severidade aos 7 DAI	-0,458	*	0,042
Câmara úmida constante, severidade aos 8 DAI	-0,452	*	0,045
Câmara úmida constante, AACPDN da severidade até os 8 DAI	-0,452	*	0,045
Câmara úmida constante, severidade aos 10 DAI	-0,474	*	0,035
Câmara úmida constante, AACPDN da severidade até os 10 DAI	-0,458	*	0,042
Câmara úmida constante, severidade aos 12 DAI	-0,486	*	0,030
Câmara úmida constante, AACPDN da severidade até os 12 DAI	-0,486	*	0,030

¹ DAS = dias após a sementeira

² DAI = dias após a inoculação

³ AACPDN = Área abaixo da curva de progresso da doença normalizada

APÊNDICE B

Incidência de podridão-de-carvão em genótipos de soja, em ensaio de campo realizado em Sertaneja-PR, safra 2015-2016

Genótipo	Incidência (%)
NS 4823 RR	6,67
BMX Elite IPRO	8,33
GDM 15I029	10,00
DM 4336	11,67
BMX Potência RR	16,67
GDM 15I024	21,67
P95R51	26,67
DM 4333	20,00
GDM 15I032	23,33
Vmax	20,00
GDM 15I036	20,00
BMX Apolo RR	36,67
GDM 15I040	30,00
GDM 15I028	46,67
DM 61I59	18,33
DM 4313	15,00
BMX Magna RR	18,33
BMX Classe RR	20,00
GDM 15I038	41,67
DM 4357	30,00
GDM 15I030	23,33
DM 4315	33,33
DM 11707	56,67
GDM 15I022	55,00
GDM 15I023	46,67
DM 6458	33,33
GDM 15I037	50,00
NA5909	56,67
BMX Turbo RR	53,33
BMX Tornado RR	53,33
GDM 15I003	76,67