

Estudo de métodos de inoculação para a avaliação de cultivares de soja a *Fusarium tucumaniae*

Helena Baroni Junqueira Franco^{(1), (2)}; Maria Aparecida Pessôa da Cruz Centurion⁽¹⁾, José Carlos Barbosa⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal, SP, Avenida de acesso Paulo Donato Castellane, s/n, CEP 14 884-900;

⁽²⁾ Bolsista da Fapesp, aluna de mestrado do programa de Produção Vegetal da FCAV/Unesp/Jaboticabal.

Autor para correspondência: José Carlos Barbosa

Data de chegada: 19/03/2007. Aceito para publicação em: 13/12/2007

1457

RESUMO

Franco, H.B.J.; Centurion, M.P.P.C.; Barbosa, J.C.;. Estudo de métodos de inoculação para a avaliação de cultivares de soja a *Fusarium tucumaniae*. *Summa Phytopathologica*, v.35, n.1, p.32-38, 2009

Avaliou-se a reação das cultivares de soja, IAS-5, FT-Cometa, CAC-1, Monarca e MG/BR 46 (Conquista), consideradas resistentes, e de FT-Estrela e FT-Cristalina, suscetíveis a *F. tucumaniae*, por dois métodos. Foram inoculadas plântulas e folhas destacadas de soja através do método de grãos de sorgo e grãos de aveia, respectivamente. As avaliações de severidade da doença foram efetuadas semanalmente utilizando-se escalas de notas tanto para sintomas observados na parte aérea das plântulas como para o sistema radicular, e também através da porcentagem de plântulas

mortas. Avaliou-se também a altura de plantas e os comprimentos das lesões externa e interna da haste. A relação das cultivares em ordem crescente de porcentagem de plantas mortas foi CAC-1 (47%), Monarca (60%), MG/BR 46 (Conquista) (61%), IAS-5 (64%), FT-Cristalina (84%), FT-Cometa (86%) e FT-Estrela (90%). Em folhas destacadas, inicialmente, o patógeno infectou tecidos das regiões próximas ao pecíolo, porém este método não foi adequado na caracterização dos materiais, uma vez que ocorre senescência precoce das folhas.

Palavras-chave adicionais: síndrome da morte súbita, podridão vermelha da raiz, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *glycines* K. W. Roy, *Glycine max* (L.) Merrill.

ABSTRACT

Franco, H.B.J.; Centurion, M.P.P.C.; Barbosa, J.C.;. Inoculation methods study to evaluation soybean cultivars to *Fusarium tucumaniae*. *Summa Phytopathologica*, v.35, n.1, p.32-38, 2009

The reaction of resistant soybean cultivars IAS-5, FT-Cometa, CAC-1, Monarca and MG/BR 46 (Conquista) and the susceptible cultivars FT-Estrela and FT-Cristalina, to *F. tucumaniae* were evaluated. Soybean seedlings were inoculated by the grain sorghum method; and detached leaves were inoculated by the oat grain method. Disease severity was weekly evaluated using a degree scale for the symptoms observed in the aerial, as well as in the root system, of the seedlings. The percentage of dead seedlings also was evaluated. Plant

height, length of the internal, and external lesions in the culm, were examined. The relation of the cultivars in growing order of percentage of dead plants was CAC-1(47%), Monarca(60%), MG/BR 46 (Conquista)(61%), IAS-5(64%), FT-Cristalina(84%), FT-Cometa(86%) and FT-Estrela(90%). Infection of detached leaves by the pathogen in the tissues near to the petiole was observed. However this method was unable to discriminate soybean cultivar for resistance to SDS, because of the high level of premature leaf death.

Keywords: sudden death syndrome (SDS), *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *glycines* K. W. Roy, *Glycine max* (L.) Merrill

A podridão vermelha da raiz da soja (PVR) ou síndrome da morte súbita (SMS) é uma das doenças mais preocupantes dentre as que ocorrem atualmente em soja no Brasil devido à sua dificuldade de controle. Essa doença era tradicionalmente associada ao fungo *Fusarium* (Mart.) Sacc. f. sp. *glycines* K. W. Roy, mas, recentemente Aoki et al. (1) determinou que, na América do Sul, ela é causada pela espécie *Fusarium tucumaniae* sp. nov., que é filogeneticamente e morfológicamente diferente de *Fusarium virguliforme* sp. nov., causador da doença na América do Norte. Foi observada pela primeira vez na safra 1981/82 em São Gotardo, MG (32), e tem apresentado crescente aumento em área e severidade desde sua constatação (4).

O sintoma de infecção na raiz inicia-se com uma mancha avermelhada, mais visível na raiz principal e geralmente localizada um a dois centímetros abaixo do nível do solo. A lesão expande, circundando a raiz que passa a apresentar coloração castanho avermelhado escuro. A necrose situa-se no tecido cortical, enquanto o

lenho da raiz adquire uma coloração castanho-clara, estendendo-se pelo tecido lenhoso da haste a vários centímetros acima do nível do solo. A interferência no sistema de absorção e de translocação da água e sais minerais induz a formação do sintoma foliar típico de folha "carijó", com manchas cloróticas e necróticas internervais (5). A doença é mais severa em baixas temperaturas e alta umidade (26).

Informações disponíveis até o momento indicam que, com exceção de cultivares resistentes, nenhuma prática agrônômica tem sido adequada para reduzir o impacto da doença. A rotação de cultura com o milho ou a cobertura com milheto não controlam a doença. Além disso, safras chuvosas e semeadura direta favorecem a incidência da doença (5).

Por ser causada por um fungo de solo e pela expressão dos sintomas ser influenciada pelas condições edáficas e climáticas, muitos pesquisadores têm avaliado a reação de variedades a PVR no próprio campo, instalando experimentos em diversos locais. Outros, porém, têm utilizado diversas metodologias de inoculação artificial e avaliação

dos sintomas em ambientes controlados; no entanto, uma metodologia precisa e segura ainda não foi desenvolvida, havendo controvérsias na indicação do método mais adequado para avaliação de genótipos nos programas de melhoramento visando desenvolver cultivares mais resistentes a PVR (9).

O uso de grãos de sorgo colonizados para se proceder à inoculação durante a sementeira tem reduzido a variabilidade dos resultados, tornando possível a realização de análises de rotina em casa de vegetação (24). Desta forma, este é o método que se apresenta como o mais promissor para a avaliação de genótipos utilizando inoculação artificial (9).

A cultura da folha destacada, definida como a manutenção de folhas vivas por um certo período após ter sido destacada da planta mãe (27, 28) é uma técnica que apresenta vantagens quanto à economia de espaço, de material vegetal e de inóculo; facilidade de controle e manipulação de fatores ambientais; redução na contaminação; uniformidade experimental; facilidade e exatidão nas observações, uma vez que, se pode examinar o material sob microscópio sem prejudicar a cultura; eliminação quanto à necessidade de luz quando o cultivo é feito em solução de sacarose; crescimento exuberante de alguns parasitas obrigatórios como ferrugem e oídios (12, 14, 21, 27, 28). Assim fitopatologistas começaram a utilizá-la para testes de inoculação e estudos de fisiologia de parasitismo (28).

Mais recentemente, Franco (7) testou a viabilidade da técnica da folha destacada para determinação da reação de genótipos de soja à PVR e obteve resultados que evidenciaram que *F. tucumaniae* infecta a folha destacada enraizada inoculada pelo método do palito de dente, provocando morte do pecíolo e amarelecimento gradual da folha a partir da base. Entretanto, o método do palito de dente nem sempre caracterizou a maior suscetibilidade da cultivar FT-Estrela em relação à cultivar MG/BR 46 (Conquista) considerada resistente (4). O autor concluiu que o emprego da técnica da folha destacada poderá ser promissor nos estudos de determinação de reações de genótipos de soja à *F. tucumaniae* com ajustes de metodologia.

Desse modo, no presente trabalho, foram avaliadas metodologias de inoculação artificial do patógeno em folhas destacadas e em plântulas de soja, visando a caracterização da reação das cultivares de soja à *F. tucumaniae*.

MATERIAL E MÉTODOS

Reação de cultivares de soja a *F. tucumaniae* avaliadas em folhas destacadas.

Foram testadas sete cultivares de soja: IAS-5, FT-Cometa, CAC-1, MG/BR 46 (Conquista) consideradas resistentes (4), e Monarca, também tida como resistente (2), e, FT-Estrela e FT-Cristalina, consideradas suscetíveis (9) a *Fusarium tucumaniae*.

Folhas de soja foram destacadas de plântulas cultivadas em casa de vegetação até o estágio VI (6) e acondicionadas em placas de Petri contendo a mistura de terra, areia e vermiculita (proporção 12:4:2). A calagem e adubação dessa mistura foi feita de acordo com as recomendações de Malavolta (18). A coleta das plantas foi efetuada no final da tarde conforme recomendação de Tuite (27). No laboratório, as folhas foram destacadas da planta, cortando-se o pecíolo imerso em água destilada com auxílio de tesoura, sendo em seguida colocadas em placas de Petri contendo cerca de 50 ml de mistura de terra, areia e vermiculita umedecida com 20 ml de água destilada. O pecíolo das folhas foi introduzido no solo e uma lâmina de vidro foi utilizada para evitar o contato do limbo foliar com a terra. Sob as tampas das placas de Petri foi colocado plástico transparente para manutenção da umidade da terra.

Para o preparo do meio de cultura, discos de colônia de *F. tucumaniae* cultivado em BDA foram transferidos para meio de

grãos de aveia, dez dias antes de se realizar a inoculação em folhas destacadas. Este procedimento foi semelhante ao proposto por Lim (17), que utilizou grãos de aveia, seguindo-se as modificações efetuadas por Hartman et al. (11) e Balardin & Rubin (3), que utilizaram grãos de sorgo. Foram utilizados erlenmeyers de 250 ml, onde foram colocados cerca de 100 cm³ de grãos de aveia previamente embebidos em água. A embebição foi efetuada durante 2 horas, sendo a água restante eliminada e os frascos contendo as sementes embebidas autoclavados duas vezes, durante 20 minutos a 120°C, com intervalo de 24 horas. Após o resfriamento, para cada erlenmeyer foram transferidos 15 discos de 5 mm de diâmetro de colônias do fungo em BDA. Em seguida adicionou-se 10 ml de água destilada estéril para promover melhor dispersão dos esporos e micélio e umedecimento dos grãos de aveia. Para promover o crescimento uniforme do micélio do fungo em torno dos grãos de aveia e para manter os grãos soltos, os frascos foram agitados a cada dois a três dias, e foram incubados em câmara de germinação a 24°C e fotoperíodo de 12 horas. Na inoculação foram utilizados dois grãos de aveia, colocados em posição oposta encostados à região do pecíolo das folhas destacadas, com auxílio de uma pinça.

Após inoculação as folhas destacadas foram incubadas em câmaras de germinação com temperaturas ajustadas para 15°C e 25°C e fotoperíodo de 12h.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 10 repetições, sendo cada parcela constituída por uma placa de Petri contendo duas folhas destacadas. Foram incluídas testemunhas apenas para cultivares suscetíveis.

Foram realizadas três avaliações, aos 13, 21 e 27 dias após a inoculação, empregando-se escala de notas de 0 a 5 proposta por Yorinori (30) para avaliação do nível de infecção (NI) de doenças foliares, em que: 0 = sem sintomas; 1 = traços a 10% de área foliar infectada (AFI); 2 = 11 a 25% AFI; 3 = 26 a 50% de AFI; 4 = 51 a 75% AFI; 5 = 76 a 100% AFI.

Reação de cultivares de soja a *F. tucumaniae* avaliadas em plântulas

Para este ensaio em casa de vegetação, foram testadas as mesmas sete cultivares de soja utilizadas no ensaio com folhas destacadas.

O cultivo foi efetuado em vasos contendo a mistura de terra, areia e vermiculita (proporção 15:2:1), calcareada e adubada de acordo com recomendações de Malavolta (18) para a cultura da soja. A inoculação foi efetuada através do método de grãos de sorgo colonizados pelo patógeno. O preparo dos grãos de sorgo foi semelhante ao descrito anteriormente para o preparo de grãos de aveia. A inoculação foi realizada no momento da sementeira, colocando-se no fundo de cada cova (\pm 3cm de profundidade) cinco grãos de sorgo colonizados com o patógeno. Estes foram cobertos com uma camada de solo de cerca de 1 cm e, em seguida, semeou-se a soja. Aos 15 dias após a emergência, após o encharcamento do solo, foi efetuada outra inoculação, pressionando-se dois grãos de sorgo colonizados (a cerca de 1cm de profundidade), com o auxílio de um bastão de vidro, junto à região do colo de cada planta e em posição oposta (9).

A inoculação foi efetuada na época de outono/inverno, e os vasos mantidos em casa de vegetação a temperatura ambiente.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com dez repetições, sendo a parcela constituída por um vaso com cinco plântulas. As testemunhas foram efetuadas apenas nas cultivares suscetíveis.

A primeira avaliação dos sintomas foi efetuada 15 dias após a inoculação, simultaneamente à segunda inoculação, e as cinco avaliações seguintes foram realizadas semanalmente, através de escala de notas de 0 a 5, proposta por Yorinori (30) e adaptada por Franco (7).

A avaliação também foi efetuada através da escala de notas baseada

Tabela 1. Níveis de infecção⁽¹⁾ de *Fusarium tucumaniae* obtidos em folhas destacadas, de sete cultivares de soja inoculadas pelo método de grãos de aveia e incubadas em solo em duas temperaturas.

Tratamentos (A)	1ª Avaliação	2ª Avaliação	3ª Avaliação
	13 DAI ⁽²⁾	21 DAI	27 DAI
CAC-1	1,95ab ⁽³⁾	2,90ab	3,08ab
MG/BR 46 (Conquista)	2,45a	3,48a	3,93a
FT-Cometa	2,38ab	3,08ab	3,48a
Monarca	1,95ab	2,98ab	3,53a
FT-Estrela T ⁽⁴⁾	1,60b	2,23b	2,33b
FT-Estrela	2,48a	3,20ab	3,45a
FT-Cristalina T ⁽⁴⁾	0,25c	1,00c	1,23c
FT-Cristalina	2,37ab	3,15ab	3,45a
IAS-5	2,55a	3,58a	4,00a
F	15,11**	11,31**	13,04**
Temperatura (B)			
15°C	1,42b	2,07b	2,45b
25°C	2,57a	3,61a	3,87a
F	84,85**	96,22**	77,32**
Interações			
Teste F A x B	6,83**	2,94**	2,69**
C.V. (%)	41,93	37,03	34,32

⁽¹⁾Médias (de 10 repetições) apresentadas em escala original, de 0 a 5 (proposta por Yorinori (30)), onde 0 = sem sintomas; 1 = traços a 10% de área foliar infectada (AFI); 2 = 11 a 25% AFI; 3 = 26 a 50% de AFI; 4 = 51 a 75% AFI; 5 = 76 a 100% AFI.

⁽²⁾DAI = Dias após a inoculação

⁽³⁾Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

⁽⁴⁾Testemunhas

na severidade dos sintomas foliares utilizada por Hartman et al. (11) e modificada por Fronza (9).

Também avaliou-se a porcentagem de plântulas mortas, contando-se plântulas sadias, plântulas infectadas (PI) e plântulas mortas (PM). O critério de separação das reações dos genótipos baseou-se na porcentagem de plântulas mortas (%PM). O cálculo da porcentagem de plântulas mortas (%PM) foi feito utilizando a seguinte fórmula: %PM = (PM + PI/2)100/TP, onde: PM = número de plântulas mortas; PI = número de

plântulas infectadas; TP = total de plântulas inoculadas. A reação das variedades foi discriminada em cinco categorias, conforme a porcentagem de plântulas mortas (%PM), de acordo com o seguinte critério: R = Resistente: 0% a 25% PM; MR = Moderadamente Resistente: 26% a 50% PM; MS = Moderadamente Suscetível: 51% a 75% PM; S = Suscetível: 76% a 90% PM; AS = Altamente Suscetível: acima de 90% PM. Esta forma de avaliação da reação de plântulas a *F. tucumaniae* foi baseada na proposta de Yorinori (29) para avaliação do cancro da haste.

Após esta avaliação, de reação de plântulas, foi medida a altura das plantas, o comprimento da lesão externa e interna da haste, com auxílio de uma régua graduada. Realizou-se também a avaliação dos sintomas presentes na raiz, através de uma escala de notas de 1 a 3 (onde 1= raiz sem sintoma; 2= raiz pivotante totalmente ou parcialmente necrosada, porém com raízes secundárias normais; 3= sistema radicular totalmente necrosado). Para isso efetuou-se a lavagem das raízes em água corrente, em seguida a avaliação visual e posteriormente a secagem em estufa, para obtenção da massa seca da raiz por parcela experimental.

Análises estatísticas dos resultados.

Os resultados obtidos, em casa de vegetação e folhas destacadas, foram submetidos a análises de variância pelo teste F, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No experimento com folhas destacadas utilizou-se o esquema fatorial 9 x 2 com nove tratamentos (sete cultivares + duas testemunhas representadas por duas cultivares suscetíveis não inoculadas) e duas temperaturas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Reação de cultivares de soja a *F. tucumaniae* avaliadas em folhas destacadas

A Tabela 1 apresenta os resultados dos níveis de infecção de *F. tucumaniae* obtidos em folhas destacadas de sete cultivares de soja inoculadas pelo método de grãos de aveia, incubadas em solo em duas temperaturas. Observou-se que na terceira avaliação as cultivares inoculadas não diferiram significativamente entre si, apenas das testemunhas. Houve amarelecimento de algumas testemunhas, o que dificultou a interpretação dos resultados. Embora a folha de soja sobreviva e enraíze em alto percentual, pode ocorrer morte prematura, sem que se consiga detectar a causa, que permita fazer os devidos ajustes para futuros ensaios. Como relatado por Yarwood (28) uma

Tabela 2. Nível de infecção⁽¹⁾ de *Fusarium tucumaiae* em folhas destacadas de soja, na interação de tratamentos dentro de temperaturas na primeira, segunda e terceira avaliações.

Tratamento (A)	Temperaturas (B)								
	1ª Av.		F	2ª Av.		F	3ª Av.		F
	15°C	25°C		15°C	25°C		15°C	25°C	
CAC-1	1,45Ba ⁽²⁾	2,45Aab	7,13**	2,35Ba	3,45Aab	5,46*	2,60Aa	3,55Aab	3,83*
MG/BR 46 (Conquista)	2,00Ba	2,90Aab	5,77*	2,75Ba	4,20Aa	9,49**	3,25Ba	4,60Aa	7,74**
FT-Cometa	2,25Aa	2,50Aab	0,45 ^{NS}	2,80Aa	3,35Aab	1,37 ^{NS}	3,15Aa	3,80Aab	1,79 ^{NS}
Monarca	1,85Aa	2,05Ab	0,29 ^{NS}	2,50Ba	3,45Aab	4,07*	3,20Aa	3,85Aab	1,79 ^{NS}
FT-Estrela T ⁽³⁾	0,00Bb	3,20Aab	72,99**	0,60Bb	3,85Aa	47,68**	0,80Bb	3,85Aab	39,51**
FT-Estrela	1,35Ba	3,60Aa	36,09**	2,15Ba	4,25Aa	19,91**	2,60Ba	4,30Aa	12,28**
FT-Cristalina T ⁽³⁾	0,00Ab	0,50Ac	1,78 ^{NS}	0,00Bb	2,00Ab	18,06**	0,10Bb	2,35Ab	21,50**
FT-Cristalina	1,85Ba	2,90Aab	7,86**	2,60Ba	3,70Aa	5,46*	2,95Ba	3,95Aa	4,25*
IAS-5	2,05Ba	3,05Aab	7,13**	2,90Ba	4,25Aa	8,23**	3,40Ba	4,60Aa	6,12*
F	10,39**	11,55**		9,80**	4,45**		11,82**	3,90**	

⁽¹⁾Médias (de 10 repetições) do nível de infecção em escala original, de 0 a 5 (proposta por Yorinori (30)), onde 0 = sem sintomas; 1 = traços a 10% de área foliar infectada (AFI); 2 = 11 a 25% AFI; 3 = 26 a 50% de AFI; 4 = 51 a 75% AFI; 5 = 76 a 100% AFI.

das desvantagens do método da folha destacada é a baixa sobrevivência das folhas. Com relação a temperatura, a que favoreceu o desenvolvimento dos sintomas da doença foi a de 25°C, desde a primeira até a terceira avaliação.

Na Tabela 2, em que se apresenta a interação tratamentos dentro de temperaturas na primeira, segunda e terceira avaliações, pode-se notar que, na primeira avaliação, o nível de infecção em folhas destacadas, para as sete variedades testadas, foi superior na temperatura de 25°C. Analisando-se tratamentos dentro de cada temperatura, percebe-se que, a 15°C, FT-Cometa apresenta maior média de nível de infecção, porém não difere significativamente das demais cultivares, exceto das testemunhas. A 25°C, FT-Estrela foi mais afetada, diferindo significativamente apenas da cultivar Monarca e da testemunha FT-Cristalina. Nas segunda e terceira avaliação, pode-se notar que o nível de infecção em folhas destacadas, para as sete variedades testadas, foi superior em ambiente a 25°C, assim como ocorrido na primeira avaliação. Quando se analisa tratamentos dentro de cada temperatura, percebe-se que, a 15°C, IAS-5 apresenta maior média de nível de infecção, porém não difere significativamente das demais cultivares, exceto das testemunhas. A 25°C, FT-Estrela, IAS-5 e MG/BR 46 (Conquista) apresentaram médias superiores de nível de infecção, porém só diferiram significativamente da testemunha FT-Cristalina.

Reação de cultivares de soja a *F. tucumaniae* avaliadas em plântulas

Avaliação dos sintomas da parte aérea e do sistema radicular

Nível de infecção NI

Na Figura 1, estão apresentados os resultados de avaliações dos níveis de infecção (NI) de variedades de soja cultivadas no outono/inverno, em condições de casa de vegetação inoculadas com *F. tucumaniae*, pelo método de grãos de sorgo (GS) colonizados. Na 1ª avaliação, efetuada aos 15 dias após a inoculação, não foram observados sintomas foliares da doença. No decorrer de seis semanas de avaliações, verificou-se evolução dos sintomas, sendo que na 6ª avaliação, observaram-se tendências das cultivares inoculadas FT-Estrela, FT-Cristalina e FT-Cometa a maiores médias de níveis de infecção, e CAC-1 a menor. Um aspecto importante deve ser ressaltado. No decorrer da experimentação, foi observado que as

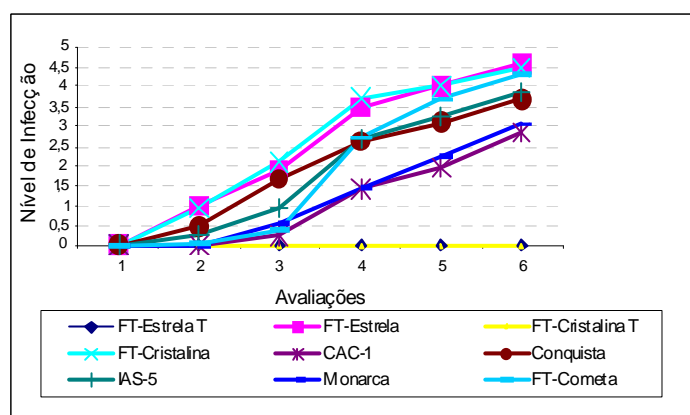


Figura 1. Nível de infecção (NI)⁽¹⁾ de *Fusarium tucumaniae* obtido em variedades de soja cultivadas no outono/inverno em condições de casa de vegetação, inoculadas pelo método de grãos de sorgo (GS) colonizados.

⁽¹⁾Nível de infecção avaliado através de escala de notas de 0 a 5 (proposta por Yorinori (30), e adaptada por Franco (7)), sendo que : 0 = planta sem sintomas; 1 = traços a 10% da planta infectada (PI); 2 = 11 a 25% da PI; 3 = 26 a 50% da PI; 4 = 51 a 75% da PI e 5 = 76 a 100% da PI.

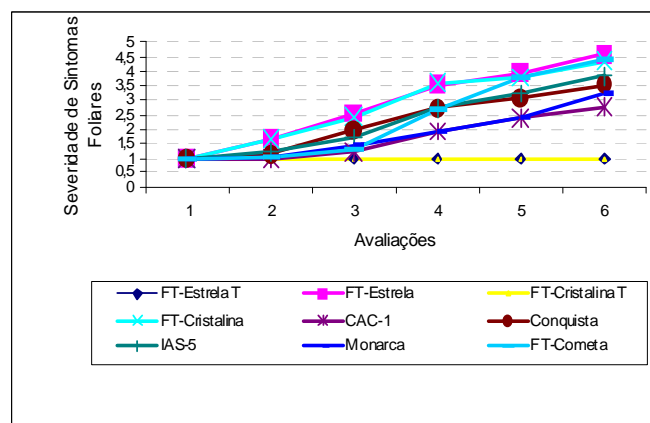


Figura 2. Severidade dos sintomas foliares (SSF)⁽¹⁾ de *Fusarium tucumaniae* obtidas em variedades de soja cultivadas no outono/inverno em condições de casa de vegetação, inoculadas pelo método de grãos de sorgo (GS) colonizados.

⁽¹⁾Severidade dos sintomas foliares avaliada através de escala de notas de 1 a 5 (proposta por Hartman et al. (11) e modificada por Fronza (9)) sendo que : 1=ausência de sintomas foliares visíveis; 2=leve desenvolvimento dos sintomas, com clorose em mosaico, e deformação ou encarquilhamento dos folíolos; 3=moderado desenvolvimento dos sintomas, com clorose internerval e necrose na borda dos folíolos; 4=elevado desenvolvimento dos sintomas, com clorose e necrose internerval (até 50% de área foliar afetada por necrose); 5=severo desenvolvimento dos sintomas, com clorose e necrose internerval e/ou plantas mortas ou severa restrição no desenvolvimento das plantas (51 a 100% de área foliar afetada por necrose).

condições climáticas do município de Jaboticabal, na época de outono/inverno, favoreceram a manifestação da doença. Analisando-se os resultados da 3ª a 6ª avaliação, verificou-se que a evolução dos sintomas das cultivares classificadas como resistentes foi mais lenta do que naquelas classificadas como suscetíveis. Essa tendência foi confirmada na 6ª avaliação em que se pode observar maiores níveis de resistência em CAC-1 e Monarca, e maior suscetibilidade em FT-Estrela e FT-Cristalina.

Severidade dos sintomas foliares (SSF)

Na Figura 2, estão apresentados os resultados das avaliações da severidade dos sintomas foliares (SSF) de variedades de soja cultivadas no outono/inverno 2006 em condições de casa de vegetação inoculadas com *F. tucumaniae*, pelo método de grãos de sorgo (GS) colonizados. Os resultados obtidos através deste método de avaliação foram semelhantes aos anteriormente apresentados na Figura 1, confirmando a tendência de maior nível de resistência nas cultivares Monarca e CAC-1, e maior suscetibilidade em FT-Estrela e FT-Cristalina.

Porcentagem de plântulas mortas (%PM)

Na Tabela 3 estão apresentadas as médias de porcentagem de plântulas mortas (%PM) obtidas em variedades de soja inoculadas com *F. tucumaniae* pelo método de grãos de sorgo (GS), em condições de casa de vegetação. A cultivar FT-Estrela apresentou reação de alta suscetibilidade (90,25% PM), FT-Cometa e FT-Cristalina se comportaram como suscetíveis. IAS-5, Monarca e MG/BR 46 (Conquista) apresentaram reação de moderada suscetibilidade. CAC-1, com 46,89% de plântulas mortas, foi caracterizada como moderadamente resistente.

Em São Gotardo, na safra 1991/92, foi observada variação na expressão do sintoma foliar entre duas cultivares. "UFV-10" apresentou 100% das plantas infectadas com folha "carijó", enquanto "CAC-1" apresentou apenas amarelecimento prematuro das folhas, com raras ocorrências de folha "carijó" (31).

Através de inoculações artificiais (palito de dente e suspensão de

Tabela 3. Porcentagem de plântulas mortas (%PM)⁽²⁾, comprimento da lesão externa (LE), lesão interna (LI) e nível de infecção de raiz (NIR)⁽⁴⁾ obtidos em variedades de soja inoculadas com *Fusarium tucumaniae* pelo método de grãos de sorgo(GS), em condições de casa de vegetação (outono/inverno).

Variedades	%PM	Reação ⁽³⁾	LE	LI	NIR
CAC-1	46,89 ⁽¹⁾	MR	4,01bcd ⁽⁵⁾	10,27c	2,56c
MG/BR 46 (Conquista)	61,00	MS	4,73abcd	16,56bc	2,62bc
FT-Cometa	86,00	S	11,40ab	29,20a	2,80ab
Monarca	60,00	MS	2,03cd	9,99c	2,56c
FT-Estrela T ⁽⁶⁾	0,00	—	0,00d	0,00d	1,00d
FT-Estrela	90,25	AS	12,39a	20,47ab	2,85ab
FT-Cristalina T ⁽⁶⁾	0,00	—	0,00d	0,00d	1,00d
FT-Cristalina	84,00	S	7,73abcd	16,17bc	2,86a
IAS-5	64,00	MS	9,11abc	16,49bc	2,72abc
F			6,53**	20,73**	216,07**
C.V. (%)			101,38	49,32	7,04
dms (5%)			8,26	9,31	0,23

⁽¹⁾Média de 10 repetições (50 plantas avaliadas/cultivar)

⁽²⁾%PM = (PM + PI/2)100/TP, onde: PM = número de plântulas mortas; PI = número de plântulas infectadas; TP = total de plântulas inoculadas (proposta de Yorinori (29) para avaliação do cancro da haste)

⁽³⁾R = Resistente: 0% a 25%PM; MR = Moderadamente Resistente: 26% a 50%PM; MS = Moderadamente Suscetível: 51% a 75%PM; S = Suscetível: 76% a 90%PM; AS = Altamente Suscetível: acima de 90%PM (proposta de Yorinori (29) para avaliação do cancro da haste).

⁽⁴⁾Escala de notas que varia de 1 a 3 (onde 1= raiz sem sintoma; 2= raiz pivotante totalmente ou parcialmente necrosada, porém com raízes secundárias normais; 3= sistema radicular totalmente necrosado).

⁽⁵⁾Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

⁽⁶⁾Testemunhas.

micélio + esporos) Yorinori & Nomura (33) apresentaram CAC-1 como moderadamente resistente, assim como Embrapa (4) e Leão et al. (16), também apresentaram esta cultivar como uma das mais tolerantes a PVR.

Leão et al. (16) e Fronza (9) também verificaram que FT-Estrela e FT-Cristalina se comportaram como mais suscetíveis a PVR. A cultivar FT-Estrela apresentou reação de suscetibilidade também, em trabalho apresentado por Klingelfuss et al. (15).

Lesão interna (LI), lesão externa (LE), altura de plântula (AL), massa seca de raiz (MSR) e nível de infecção de raiz (NIR)

Comparando-se as médias de comprimento da lesão externa (LE) e lesão interna (LI) (Tabela 3) pode-se observar que houve diferenças estatísticas significativas entre os resultados obtidos para as cultivares inoculadas e testemunhas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A cultivar FT-Estrela apresentou maior lesão externa da haste, não diferindo de FT-Cometa, IAS-5, FT-Cristalina e MG/BR 46 (Conquista), porém diferiu de Monarca (menor lesão externa) e CAC-1. Com relação a LI, FT-Cometa e FT-Estrela apresentaram as maiores médias, e não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A cultivar Monarca apresentou a menor LI, e não diferiu significativamente de CAC-1, FT-Cristalina, IAS-5 e MG/BR 46 (Conquista). Com relação ao nível de infecção de raiz (NIR) (Tabela 3), pode-se notar que a infecção foi efetiva nas variedades inoculadas, todas diferiram significativamente das testemunhas, tendo FT-Cristalina, FT-Estrela e FT-Cometa apresentado maiores médias de níveis de infecção radicular e não diferiram significativamente entre si. CAC-1 foi a mais resistente, mas não diferiu de MG/BR 46 (Conquista), Monarca e IAS-5.

Como a altura de plantas e massa seca de raiz são características agrônomicas que variam de uma cultivar para outra, são apresentadas na Tabela 4, apenas as análises das cultivares suscetíveis, pois para estas é que se incluíram as testemunhas. As testemunhas apresentaram média de altura de plantas superior às inoculadas, diferindo significativamente a 5% de probabilidade, indicando que a infecção

das plantas por *F. tucumaniae* foi efetiva e provocou paralização ou redução drástica no desenvolvimento das plantas. Para Hershman et al. (13) e Melgar & Roy (20) a altura das plantas parece não ser afetada pela PVR. Entretanto, reduções da altura ocorreram em plantas inoculadas artificialmente em casa de vegetação (19, 23, 25). Observam-se diferenças estatísticas significativas entre as cultivares inoculadas e suas testemunhas, tendo as plântulas inoculadas apresentado menor média de massa seca de raiz, diferindo significativamente da testemunha. A expressão dos sintomas foliares da PVR com certeza está relacionada ao grau de destruição do sistema radicular das plantas infectadas, prejudicando a absorção de água e nutrientes e também sua posterior translocação para a parte aérea, pelos danos causados ao sistema vascular na parte inferior das plantas.

Tabela 4. Altura (AL) de plântulas e massa seca de raiz (MSR) (g), de soja cultivadas em casa de vegetação (outono/inverno) e inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, pelo método de grãos de sorgo.

Genótipos	AL	MSR
FT-Estrela T ⁽²⁾	66,03a ⁽¹⁾	1,06a
FT-Estrela	32,71b	0,26b
F	101,84**	115,73**
C.V. (%)	14,96	25,27
dms (5%)	6,93	0,1568
FT-Cristalina T ⁽²⁾	88,14a	0,98a
FT-Cristalina	29,15b	0,25b
F	277,20**	92,13**
C.V. (%)	13,51	27,21
dms (5%)	7,44	0,1602

⁽¹⁾Médias (de 10 repetições (50 plantas avaliadas/cultivar)) seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

⁽²⁾Testemunhas.

Tabela 5. Coeficientes de correlação[#] entre nível de infecção (NI), severidade dos sintomas foliares (SSF), porcentagem de plântulas mortas(%PM), nível de infecção de raiz (NIR), massa seca de raiz (MSR), altura de plantas (AL), lesão externa na haste (LE) e lesão interna na haste (LI), em plântulas de soja inoculadas com *Fusarium tucumaniae*, para o método de grãos de sorgo.

	NI	SSF	%PM	NIR	MSR	AL	LE	LI
NI	---	0,98** ⁽¹⁾	0,96**	0,94**	-0,87**	-0,83**	0,58**	0,81**
SSF		---	0,96**	0,89**	-0,84**	-0,84**	0,62**	0,83**
%PM			---	0,91**	-0,84**	-0,80**	0,59**	0,79**
NIR				---	-0,92**	-0,76**	0,51**	0,72**
MSR					---	0,76**	-0,50**	-0,67**
AL						---	-0,56**	-0,66**
LE							---	0,72**
LI								---

[#]Noventa pares de dados correlacionados.

^{(1)**} significativo a 1% de probabilidade.

* significativo a 5% de probabilidade.

Análises de correlação

Na Tabela 5, pode-se observar os valores dos coeficientes de correlação entre nível de infecção (NI), severidade dos sintomas foliares (SSF), porcentagem de plântulas mortas (%PM), nível de infecção de raiz (NIR), massa seca de raiz (MSR), altura de plantas (AL), lesão externa na haste (LE) e lesão interna na haste (LI), em plântulas de soja inoculadas com *F. tucumaniae*, para o método de grãos de sorgo. Observou-se correlação significativa a 1% de probabilidade entre quase todos os dados analisados, porém a correlação foi negativa entre MSR e NI, SSF, %PM, NIR, LE e LI, indicando que quanto menor a massa seca de raiz, maior será o nível de infecção, a severidade de sintomas foliares, a porcentagem de plântulas mortas, o nível de infecção de raiz, e o tamanho das lesões externa e interna da haste; entre AL e NI, SSF, %PM, NIR, LE e LI, mostrando que quanto menor a altura de plantas, maior será o nível de infecção, a severidade de sintomas foliares, a %plântulas mortas, o nível de infecção de raiz, a lesão externa e interna da haste.

Na Tabela 6 estão os coeficientes de correlação dos níveis de infecção de *Fusarium tucumaniae* entre casa de vegetação (NI CV) e folha destacada a 15°C (NI FD 15°C) e folha destacada a 25°C (NI FD 25°C), analisando-se as variedades em conjunto. Houve correlação positiva e significativa a 1% de probabilidade entre nível de infecção foliar em casa de vegetação e folhas destacadas, tanto a 15 quanto a 25°C, quando se analisam as cultivares conjuntamente, porém a correlação foi maior na temperatura de 15°C.

A inoculação pelo método de grãos de sorgo, em plântulas de soja, visando a caracterização de reação de cultivares de soja à *F. tucumaniae*, em casa de vegetação – outono/inverno 2006, resultou em infecção das plantas, e os sintomas típicos da doença foram observados, tendo FT-Estrela alcançado a maior porcentagem de plantas mortas (90,25%). Segundo Gásperi et al. (10), tanto o método “palito-de-dente” quanto o método “grão de sorgo” foram eficientes

Tabela 6. Coeficientes de correlação[#] entre nível de infecção em casa de vegetação (NI CV), em folha destacada a 15°C (NI FD 15°C) e folha destacada a 25°C (NI FD 25°C), em plântulas de soja inoculadas com *Fusarium tucumaniae*.

	NI CV	NI FD 15°C	NI FD 25°C
NI CV	---	0,69** ⁽¹⁾	0,32**
NI FD 15°C		---	0,53**
NI FD 25°C			---

[#]Noventa pares de dados correlacionados.

^{(1)**} significativo a 1% de probabilidade.

* significativo a 5% de probabilidade.

para reproduzir a doença nas plantas inoculadas.

A expressão dos sintomas foliares da PVR deve estar relacionada com o grau de destruição do sistema radicular das plantas infectadas, prejudicando a absorção de água e nutrientes e também sua posterior translocação para a parte aérea, pelos danos causados ao sistema vascular na parte inferior das plantas (9). As cultivares FT-Cristalina, FT-Estrela e FT-Cometa, no experimento de casa de vegetação, apresentaram maiores médias de níveis de infecção radicular (Tabela 3), maiores níveis de infecção foliar (NI) (Figura 1) e maiores níveis de severidade de sintomas foliares (SSF) (Figura 2). Segundo Njiti et al. (22), tanto as raízes de cultivares suscetíveis quanto aquelas de cultivares resistentes são infectadas pelo patógeno, porém, a taxa de infecção e o desenvolvimento dos sintomas foram menores nos genótipos resistentes.

Em função de a PVR apresentar um progresso estritamente relacionado à sua epidemiologia, ainda há dificuldade para explicar a variação do aparecimento dos sintomas com os fatores ambientais, estágio da cultura e práticas de manejo (26). Este fato decorre do estabelecimento da doença ser influenciado pelas condições de umidade e temperatura do solo. Neste sentido, variações na resistência de cultivares de soja podem ser consideradas situações de escape determinando uma dificuldade adicional no manejo visando ao controle da PVR.

No caso das folhas destacadas inoculadas pelo método de grãos de aveia, observou-se que *F. tucumaniae* infectou as folhas inoculadas, provocando amarelecimento gradual da folha a partir da base, tendo maiores níveis de infecção as cultivares MG/BR 46 (Conquista), IAS-5 e FT-Estrela acondicionada a 25°C. Entretanto, houve amarelecimento de algumas testemunhas, indicando que este método, ou não é tão seguro ou necessita de ajustes de metodologia, para que a avaliação da reação de cultivares de soja à doença tenha resultados mais precisos. As hipóteses que se pode levantar para o fato ocorrido seriam um amarelecimento por senescência precoce das folhas, o estado nutricional no momento da coleta das folhas e a influência varietal.

Por este estudo, comparado ao de Franco (8), que estudou as mesmas variáveis no mesmo local, porém na época primavera/verão, tem-se que a melhor época e método para o desenvolvimento de estudos que envolvam a inoculação de *F. tucumaniae* em soja, em regiões de clima semelhante ao de Jaboticabal/SP, é a do outono/inverno, utilizando-se o método de grãos de sorgo colonizado pelo patógeno. No método da folha destacada ocorre infecção de *F. tucumaniae*, porém, não foi possível caracterizar reação das cultivares estudadas.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão das bolsas de Iniciação Científica e Mestrado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aoki, T.; O'Donnell, K.; Homma, Y.; Lattanzi, A.R. Sudden death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex, *F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. **Mycologia**, Bronx, v.95, p.660-684, 2003.
2. Associação Brasileira de Sementes e Mudanças. **Anuário Abrasem 2003**. Brasília, 2003. 164p.
3. Balardin, R.S.; Rubin, S.A.L. Reação de germoplasma de soja à *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. In: Congresso Brasileiro de Soja, 1., Londrina, 1999. **Anais**. Londrina: Embrapa Soja, 1999. p.461.
4. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tecnologia de produção de soja na região Central do Brasil 2001/02**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 267p.
5. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Tecnologia de produção de soja - região Central do Brasil 2007. **Sistemas de Produção: Embrapa Soja**, Londrina, n. 11, 2006. 225p.
6. Fehr, W.R.; Caviness, J.A. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University, Cooperative Extension Service, 1977. 11p. (Special Report, 80).
7. Franco, H.B.J. ***Fusarium solani* f. sp. *glycines*: crescimento, esporulação e viabilidade do emprego da técnica da folha destacada para estudos de reações em genótipos de soja**. 2004. 105p. Trabalho conclusão de curso - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
8. Franco, H.B.J. **Metodologias para determinação da reação de cultivares de soja à *Fusarium tucumaniae***. 2007. 88p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
9. Fronza, V. **Genética da reação da soja à *Fusarium solani* f. sp. *glycines***. 2003. 154p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
10. Gáperi, A.C.; Prestes, A. M.; Costamilan, L.M. Reação de cultivares de soja à podridão vermelha da raiz causada por *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p.544-547, 2003.
11. Hartman, G.L.; Huang, Y.H.; Nelson, R.L.; Noel, G.R. Germplasm evaluation of *Glycine max* for resistance to *Fusarium solani*, the causal organism of sudden death syndrome. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, p.515-518, 1997.
12. Hennessy, C.M.R.; Sackston, W.E. Studies on sunflower rust. V. Culture of *Puccinia helianthi* throughout its complete life cycle on detached leaves of sunflower (*Helianthus annuus*). **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.48, p.1811-1813, 1970.
13. Hershman, D.E.; Hendrix, J.W.; Stuckey, R. E.; Bachi, P. R.; Henson, G. Influence of planting date and cultivar on soybean sudden death syndrome in Kentucky. **Plant Disease**, St. Paul, v.74, p.761-766, 1990.
14. Hooker, A.L.; Yarwood, C.E.. Culture of *Puccinia sorghi* on detached leaves of corn and *Oxalis corniculata*. **Phytopathology**, St. Paul, v.56, p.536-539, 1966.
15. Klingelfuss, L. H.; Yorinori, J. T.; Destro, D. Métodos de inoculação para quantificação de resistência em soja a *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, em casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v.32, n.1, p.50-55, 2007.
16. Leão, R. Z. R.; Freitas, M. A.; Café Filho, A. C. Reação de cultivares de soja à inoculação com isolados de diferentes espécies e *formae speciales* de *Fusarium*. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.24, n.3/4, p.414-421, 1998.
17. Lim, S.M. A Technique for inoculating soybeans in the greenhouse with *Fusarium solani*. **Phytopathology**, St. Paul, v.81, p.1238, 1991. (Abstract).
18. Malavolta, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres. 1980. 251p.
19. McLean, K.; Lawrence, G.W. Interrelationship of *Heterodera glycines* and *Fusarium solani* in sudden death syndrome of soybean. **Journal of Nematology**, v.25, n.3, p.434-439, 1993.
20. Melgar, J.; Roy, K.W. Soybean sudden death syndrome: cultivar reactions to inoculation in a controlled environment and host range and virulence of casual agent. **Plant Disease**, St. Paul, v.78, p.265-268, 1994.
21. Mignucci, J.S. Development of soybean leaf cultures for maintenance and study of *Microspora diffusa*. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v.62, p.271-273, 1978.
22. Njiti, V.N.; Suttner, R.J.; Gray, L.E.; Gibson, P.T.; Lightfoot, D.A. Rate-reducing resistance to soybean sudden death syndrome. **Crop Science**, Madison, v.37, p.132-138, 1997.
23. Roy, K.W.; Lawrence, G.W.; Hodges, H.H.; McLean, K.S.; and Killebrew, J.F. Sudden death syndrome of soybean: *Fusarium solani* as incitant and relation of *Heterodera glycines* to disease severity. **Phytopathology**, St. Paul, v.79, p.191-197, 1989.
24. Rupe, J.C. Epidemiology of sudden death syndrome of soybean. In: Congresso Brasileiro de Soja, Londrina, 1999. **Anais**. Londrina:Embrapa Soja, 1999. p.139-148.
25. Rupe, J.C. Frequency and pathogenicity of *Fusarium solani* recovered from soybeans with sudden death syndrome. **Plant Disease**, St. Paul, v.73, p.581-584, 1989.
26. Scherm, H.; Yang, X.B. Development of sudden death syndrome of soybean in relation to soil temperature and soil water matric potential. **Phytopathology**, St. Paul, v.86, p.642-649, 1996.
27. Tuite, J. **Plant pathological methods**. Mineapolis: Burgess, 1969. 239p.
28. Yarwood, C.E. Detached leaf culture. **Botanical Review**, Bronx, v.12, p.1-56, 1946.
29. Yorinori, J.T. **Cancro da haste da soja: epidemiologia e controle**. Circular Técnica: Embrapa -Soja, Londrina, n. 14, 1996. 75p.
30. Yorinori, J.T. **Oídio da Soja**. Londrina: EMBRAPA Soja, 1997. 13p.
31. Yorinori, J.T. Soja (*Glycine max* (L.) Merrill): controle de doenças. In: Ribeiro do Vale, F.X.; Zambolim, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa, MG: Ministério da Agricultura e Abastecimento, 1997. v.2, p. 953-1023.
32. Yorinori, J.T.; Charchar, M.J.D.; Nasser, L.C.B.; Henning, E.A. Doenças da soja e seu controle In: Arantes, N.E.; Souza, P.I.M. **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: POTAFOS, 1993. p. 333-390.
33. Yorinori, J. T.; Nomura, S. L. Cultivares de soja resistentes à podridão vermelha da raiz causada por *Fusarium solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, p.339, 1994. Suplemento.