

ESTUDOS DE DIFERENTES MÉTODOS DE INOCULAÇÃO PARA A AVALIAÇÃO DE REAÇÃO DE RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DA SOJA A *Fusarium solani* f. sp. *glycines* NO PERÍODO DE OUTONO/INVERNO/2006. Amanda Carolina Marques Miranda Diavan, Maria Aparecida Pessôa da Cruz Centurion, Helena Baroni Junqueira Franco. -Agronomia- Departamento de Produção Vegetal- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- UNESP- Câmpus de Jaboticabal.

A soja (*Glycine max*), espécie de grande importância econômica, tem como centro de origem o continente asiático, mais precisamente a região da China antiga, sendo cultivada desde 2838 a.C. Uma das doenças que tem merecido atenção dos fitopatologistas e melhoristas é a podridão vermelha da raiz (PVR), causada pelo fungo *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, atualmente denominado *Fusarium tucuminae*. Observada pela primeira vez no Brasil na safra 1981/82 em São Gotardo - MG, tem apresentado crescente aumento de incidência e severidade desde sua constatação. Estima-se que mais de 2 milhões de hectares estejam infestados (YORINORI,2000), sendo o uso de cultivares resistentes a melhor expectativa de controle da PVR e de convivência com o patógeno causador da doença. Nas raízes, o sintoma primário de infecção da doença é uma mancha avermelhada, mais visível na raiz principal, geralmente localizada um a dois centímetros abaixo do nível do solo. Essa mancha se expande, circunda a raiz e passa da coloração vermelho-arroxeadada para castanho-avermelhada a quase negra (YORINORI et al., 1993). Na parte aérea, o amarelecimento prematuro das folhas e, com maior frequência, uma acentuada necrose entre as nervuras das folhas, resulta no sintoma conhecido como “folha carijó” (ALMEIDA et al., 1997). Além disso, infecção severa durante o florescimento e formação de vagens, geralmente resulta no aborto das flores e das vagens (HIRREL,1983; RUPE, 1989; RUPE et al., 1989; ROY et al., 1991). As perdas em termos de rendimento de grãos, basicamente, são devidas à redução no número de vagens com sementes e no peso das sementes (NJITI et al., 1998; GÁSPERI, 2000).

O objetivo do presente trabalho foi o estudar diferentes metodologias de inoculação para a avaliação da reação de resistência de genótipos de soja a *F. solani* f. sp. *glycines* no outono/inverno de 2006. O isolado SDS-5 de *F. solani* f. sp. *glycines* foi cedido pelo Dr. Natal Antônio Vello, do Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas, ESALQ/USP/Piracicaba considerado o mais patogênico já coletado no Brasil pela equipe do CNPSoja/Embrapa (FRONZA, 2003). Foram avaliados os seguintes métodos de inoculação do patógeno:

- **Método do palito de dente:** foi introduzido o palito de dente colonizado no centro do hipocótilo, cerca de 1,5 cm abaixo do nó cotiledonar, tomando-se cuidado de não atravessá-lo totalmente.

- **Método do disco de colônia:** neste caso a inoculação foi realizada de três formas: 1-) no momento da semeadura, onde no fundo de cada cova (\pm 3cm de profundidade) foram colocados cinco discos colonizados com o patógeno. Estes foram cobertos com uma camada de terra de cerca de 1 cm e, em seguida, foram colocadas as sementes de soja, que também foram cobertas com solo. Desta forma, os discos de colônia do patógeno ficaram 1 cm abaixo das sementes de soja, evitando-se o contato direto destas com o inóculo, 2-) após a emergência da plântula e o encharcamento do solo, foram pressionados dois discos de colônia (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, 3-) cinco discos de colônia foram colocados no fundo da cova e 13 dias após a emergência das plantas foi feita a inoculação com dois discos de colônia. Este último método associa os primeiro e o segundo métodos descritos anteriormente.

- **Método de grãos de sorgo colonizados com o patógeno:** foram colocados grãos de sorgo colonizados com o patógeno seguindo-se a metodologia descrita no método de disco. Além deste, testou-se a mistura de grãos de sorgo colonizados ao solo.

● **Método dos grãos de aveia colonizados com o patógeno:** a inoculação foi efetuada somente com aveia colonizada misturada com terra.

Para o método de inoculação com palito de dente colonizado com o patógeno, os palitos primeiro foram afiados, lavados, autoclavados e dispostos em círculo na placa de Petri no meio BDA simultaneamente a repicagem do patógeno. Após a repicagem do patógeno as placas foram incubadas à temperatura de 28°C, por cerca de 15 dias antes da inoculação, para promover o desenvolvimento do patógeno. Para o cultivo em grãos de aveia e de sorgo, discos de colônia de *F. solani* f. sp. *glycines* em BDA, foram parte transferidos para meio de grãos de sorgo e parte para o meio de grãos de aveia. Foram utilizados erlenmeyers de 250ml, onde foram colocados cerca de 100 cm³ de grãos de sorgo ou grãos de aveia previamente embebidos em água. A embebição foi efetuada por uma noite (cerca de 12 horas). No dia seguinte, a água restante foi eliminada e os frascos contendo as sementes embebidas foram 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 5mm de diâmetro, de colônias do fungo mantidos em BDA. Em seguida, foram adicionados 10mL de água destilada esterilizada para promover um melhor espalhamento dos esporos e micélio e o umedecimento dos grãos de sorgo. Para promover o crescimento uniforme do micélio do fungo em torno dos grãos de sorgo e para manter os grãos soltos, os frascos foram agitados periodicamente, conforme necessário (diariamente ou a cada dois a três dias). Os erlenmeyers foram incubados a 24 °C e fotoperíodo de 12 horas. A inoculação foi efetuada na cultivar suscetível, FT-Cristalina, na época outono/inverno 2006.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 9 tratamentos e cinco repetições, sendo a parcela experimental constituída por um vaso com cinco plantas. Foram efetuadas duas avaliações, sendo a primeira aos quinze dias e a segunda aos 30 dias após a inoculação. Foi utilizada a escala de notas baseada na severidade dos sintomas foliares (SSF) onde 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). Além da avaliação através da escala de notas, aos 30 dias após a inoculação foram avaliadas as reações de plântulas através da contagem de plântulas sadias (plântula sem sintoma ou com necrose ao redor do palito, mas com desenvolvimento normal), plântulas infectadas PI (plântula com necrose ao redor do palito, acompanhada de clorose, murcha ou necrose de uma ou mais folhas e com leve redução do desenvolvimento da parte aérea), PI'' (plântulas infectadas com necrose ou avermelhamento ao redor do palito (método do palito de dente) ou avermelhamento na base da haste principal (outros métodos de grãos e discos), mas com desenvolvimento normal) e plântulas mortas PM (plântula morta ou severamente afetada, com redução do desenvolvimento, clorose ou necrose entre as nervuras das folhas superiores). O critério de separação das reações dos tratamentos é baseado na porcentagem de plântulas mortas (%PM). Duas plântulas infectadas são consideradas equivalentes a uma plântula morta (2PI = 1PM). O cálculo da porcentagem de plântulas mortas (%PM) é feito utilizando-se a seguinte fórmula: $\%PM = [(PM + (PI/2) + (PI''/4)) \times 100]$ onde: PM = número de plântulas mortas; PI = número de plântulas infectadas; PI'' = plântulas infectadas com necrose ou avermelhamento ao redor do palito (método do palito de dente) ou avermelhamento na base da haste principal (outros métodos de grãos e discos), mas com desenvolvimento normal; TP = total de plântulas inoculadas. A reação dos tratamentos é 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. Também foram avaliadas as alturas das plantas, o comprimento da lesão externa, e da lesão interna da haste, com auxílio de uma régua graduada. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Média⁽¹⁾ da severidade dos sintomas foliares⁽²⁾ (SSF) da podridão vermelha da raiz (*Fusarium solani* f. sp. *glycines*) obtidos na variedade FT-Cristalina de soja inoculada com diferentes métodos no inverno 2006, em condições de casa de vegetação, de alturas de plantas, comprimento da lesão externa (L.E), comprimento da lesão interna (L.I) na haste e de porcentagem de plântulas mortas (%PM)⁽³⁾ nas plântulas inoculadas com *Fusarium solani* f. sp. *glycines* em casa de vegetação.

Tratamentos ⁽⁴⁾	L.E (cm)	L.I (cm)	ALTURA (cm)	%PM	Reação ⁽⁶⁾	SSF Avaliação
DC-1	0.06 B ⁽⁵⁾	0.54 B	102.00 A	6 B	R	1.20 A
DC-2	0.14 B	0.24 B	100.72 A	19 B	R	1.08 A
DC-3	0.72 B	5.62 B	98.52 A	14 B	R	1.40 A
GS-1	1.00 B	1.34 B	84.12 AB	26 AB	MR	2.16 A
GS-2	1.22 B	1.84 B	98.56 A	18.80 B	R	1.68 A
GS-3	5.38 B	4.76 B	58.34 BC	3 AB	MR	2.84 A
GS-T	1.82 B	2.84 B	73.06 AB	11 B	R	1.28 A
GA-T	3.08 B	10.26 AB	56.16 BC	36 AB	MR	2.64 A
PD	18.42 A	23.30 A	27.98 C	60.00 A	MS	2.84 A
CV %	110.12	117.88	20.95	68.22		44.63
Teste F	11.18 **	6.08 **	12.65 **			3.67 **

(1) Médias de 5 repetições.

(2) Severidade dos sintomas foliares (escala de Hartman et al., 1997 e modificada por Fronza, 2003).

(3) % PM = (PM + PI/2 + PI*/4)100 /TP, onde PM é o número de plântulas mortas, PI é o número de plântulas infectadas, PS é o número de plântulas sadias. (YORINORI 2000).

(4) DC-1= disco de colônia no momento da semeadura; DC-2= disco de colônia após a emergência; DC-3 = disco de colônia no momento da semeadura e após a emergência; GS-1 = grãos de sorgo no momento da semeadura; GS-2= grãos de sorgo após a emergência; GS-3= grãos de sorgo no momento da semeadura e após a emergência; GS-T= grãos de sorgo misturado com terra; GA-T= grãos de aveia misturado com terra e PD= palito de dente.

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

(6) R= resistente: 0-25% PM, MR = moderadamente resistente: 26 -50% PM, MS= moderadamente suscetível: 51-75 % e S= suscetível: 76-90%, AS= altamente suscetível: acima de 90% PM (YORINORI,1996)

Os resultados de severidade dos sintomas foliares (SSF) não apresentaram diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade na 5ª avaliação entre os métodos avaliados. Entretanto o método do palito de dente e o método do grão de sorgo inoculado na semeadura e após a emergência induziram a maiores severidades. Observa-se que no método do palito de dente obteve-se uma maior lesão externa e interna diferindo significativamente ao teste de Tukey a 5% de probabilidade dos demais tratamentos que não se diferiram entre si. Os tratamentos DC-1, DC-2, DC-3, GS-1, GS-2 e GS-T apresentaram maiores alturas das plantas diferindo significativamente dos demais tratamentos. A menor altura de plantas foi observada no método do PD e que não diferiu significativamente dos tratamentos GS-3 e GAT. Em relação à porcentagem de plântulas mortas(%PM) e reação dos tratamentos à *F. solani* f. sp. *glycines* a maior média ocorreu no tratamento PD, obtivendo reação moderadamente suscetível (60% PM), e em seguida em ordem decrescente de % PM seguem os tratamentos: GS-3, GA-T, GS-1. Com reação de moderada resistência e a de resistência apresentaram os tratamentos GS-1, GS-3 GA-T, DC-2, GS-2, DC-3, GS-T e DC-1.

Referências Bibliográficas:

- FRONZA, V. **Genética da reação da soja à *Fusarium solani* f. sp. *glycines***. Piracicaba, 2003. 154p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- GÁSPERI, A.C. **Variabilidade de isolados, reação de cultivares e danos causados por *Fusarium solani* f. sp. *glycines* em soja**. Passo Fundo, 2000. 91p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo.
- HARTMAN, G.L. et al. Germplasm evaluation of Glycine max for resistance to *Fusarium solani*, the casual organism of sudden death syndrome. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, p.515-518, 1997.
- HIRREL, M. C. Sudden death syndrome of soybean: A disease of unknown etiology. **Phytopathology**, St. Paul, v.73, p.501-502, 1983. Abstract.
- LIM, S.M. A Technique for inoculating soybeans in the greenhouse with *Fusarium solani*. **Phytopathology**, St. Paul, v.81, p.1238, 1991. /Abstract/
- NJITI, V.N. Relationship between soybean sudden death síndrome disease measures and yield components in F₆- derived lines. **Crop Science**, Madison, v.38, p.673-678, 1998.
- ROY, K. W., et al. Diagnosis of sudden death syndrome of soybean. **Plant Diagn. Quart.**, v.12, p.166-168, 1991.
- SCHERM, H.; YANG, X.B. Develepment of sudden death syndrome of soybean in relation to soil temperature and soil water matric potencial. **Phytopathology**, v.86, p.642-649, 1996.
- TORTO, G.A.; NJITI, V.; LIGHTFOOT, D.A. Loci underlying resistance to sudden death syndrome and *Fusarium solani* in field and greenhouse assays do not correspond. **Soybean Genetics Newsletter**, v.23, p.163-166, 1996.
- WRATHER, J. A. et al. Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1994. **Plant Disease**, St Paul, v.81, p.107-110, 1997.
- YORINORI, J. T. **Cancro da haste da soja: epidemiologia e controle**. Londrina: Embrapa - Soja, 1996. 75p. (Circular Técnica, 14).
- YORINORI, J.T. Evolução da ocorrência e da severidade da podridão vermelha da raiz da soja (PVR/SDS) e reação das cultivares comerciais à doença In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 22., 2000a, Cuiabá. **Resumos ...**Londrina: EMBRAPA-Soja, 2000, p.94.