

ÉRIKA SAGATA

**MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE  
GENÓTIPOS DE SOJA À *Sclerotinia sclerotiorum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Fernando Cezar Juliatti

UBERLÂNDIA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010

ÉRIKA SAGATA

**MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE  
GENÓTIPOS DE SOJA À *Sclerotinia sclerotiorum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 18 de janeiro de 2010.

Prof. Dr. Ednaldo Carvalho Guimarães

FAMAT/UFU

Profa. Dr. Jonas Jager Fernandes

ICIAG/UFU

Prof. Dr. David de Souza Jaccoud Filho

UEPG

Prof. Dr. Fernando Cezar Juliatti  
ICIAG-UFU  
(Orientador)

UBERLÂNDIA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

---

S129m Sagata, Érika, 1983-  
Métodos de inoculação e avaliação da resistência de genótipos de soja à *Sclerotinia sclerotiorum* [manuscrito] / Érika Sagata. - 2010.  
58 f. : il.

Orientador: Fernando Cezar Juliatti.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

Inclui bibliografia.

1. Soja - Resistência a doenças e pragas - Aspectos genéticos - Teses. I. Juliatti, Fernando Cezar, 1957- . II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU: 633.34:631.52

---

*Aos meus pais, Tsuyoshi Sagata e Yoko Sagata, pela educação,  
apoio, incentivo e amor incondicional durante toda a minha vida;*

*Aos meus irmãos Sanae e Yoshio Sagata, pelo carinho;*

*Ao Keynes Masayoshi Kanno, pelo amor, companheirismo  
e incentivo durante estes anos...*

## AGRADEDECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, por me conceder o dom da vida.

Aos meus queridos pais Tsuyoshi Sagata e Yoko Hashiguchi, pelo incansável apoio, amor, carinho, dedicação e incentivo.

Ao meu namorado Keynes Masayoshi Kanno pelo seu amor, carinho, paciência, companheirismo, incentivo e pelas horas dedicadas a me ajudar.

À Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade e pelo suporte para realização do curso.

À CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Dr. Fernando Cezar Juliatti, orientador, pelos ensinamentos, sugestões e amizade.

Aos amigos do programa de pós-graduação em Agronomia, pelos momentos vividos e aprendizagem.

Aos professores Dr. David de Souza Jaccoud Filho, Dr. Ednaldo Carvalho Guimarães e Prof. Dr. Jonas Jager Fernandes pela disponibilidade de participar da banca examinadora deste trabalho.

Aos funcionários Roberto Resende Santos, Abadia Belchior Gomes e principalmente ao Joaquim que me ajudou a montar os experimentos na área experimental.

Ao Zito, da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) e Leonardo G. Oliveira, da Monsato, pelas sementes de soja, disponibilizadas.

A todos os professores do curso de pós-graduação da UFU pelos conhecimentos transmitidos.

À equipe do Laboratório de Micologia e Proteção de Plantas da UFU, Fellipe Otávio Parreira Silva, Anakely Alves Resende, Anderson Monteiro Caires, Fernanda Carvalho Barros, Carla Lorena Silva, Thiago Henrique, Juliana Araújo Santos contribuíram em todos os sentidos, durante o período de execução do trabalho e pela amizade e companheirismo.

Enfim, a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, **MUITO OBRIGADA!**

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	.01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1 Etiologia, Epidemiologia e Ciclo de vida.....	03
2.2 Sintomatologia.....	06
2.3 Controle.....	07
2.4 Resistência genética.....	08
2.4.1 Métodos de inoculação utilizados para seleção de genótipos resistentes à <i>S. Sclerotiorum</i> .....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Obtenção dos isolados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	14
3.2 Inoculações no caule realizados no laboratório – 2 etapas: casa-de-vegetação e laboratório.....	14
3.2.1 Métodos de inoculação com e sem ferimento em hastes de soja.....	14
3.2.1.1 1º Etapa: Casa-de-vegetação.....	14
3.2.1.2 2º Etapa: Laboratório.....	15
3.2.1.3 Avaliação.....	15
3.2.1.4 Teste estatístico.....	16
3.3 Aplicação da metodologia com ferimento em condições de campo – 2 Etapas: Laboratório e Campo.....	16
3.3.1 Inoculação em folha destacada – 1º Etapa: Laboratório.....	16
3.3.1.1 Avaliações.....	17
3.3.2 Inoculação com ferimento no terço médio da planta – 2º Etapa: Campo.....	18
3.3.2.1 Avaliação.....	18
3.4 Determinação de metodologia de inoculação para a seleção de genótipos de soja resistentes à <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em condições de campo.....	18
3.4.1 Método de inoculação com e sem ferimento no primeiro internódio.....	19
3.4.2 Método de inoculação com e sem ferimento abaixo do primeiro trifólio totalmente expandido.....	19

3.4.3 Inoculação de <i>S. sclerotiorum</i> por três métodos: corte do caule, sem ferimento e com ferimento.....	20
3.4.3.1 Avaliação de tecido não colonizado, após a inoculação de <i>S. sclerotiorum</i> por três métodos:corte, com e sem ferimento; e dos métodos com e sem ferimento abaixo do primeiro trifólio totalmente expandido.....	21
3.4.4 Comparação entre os métodos corte do caule principal e inoculação das Hastes de soja com ferimento entre 4º e o 5º internódio (Médio).....	21
3.5 Coeficiente de Spearman.....	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1 Inoculações no caule realizadas no laboratório – 2 Etapas: Casa-de-vegetação e laboratório.....	23
4.1.1 Método de inoculação com e sem ferimento em hastes de soja com <i>S. sclerotiorum</i> .....	23
4.1.1.1 1º Experimento: inoculação com ferimento em plantas, em V <sub>4</sub> -V <sub>5</sub> .....	23
4.1.1.2 Método de inoculação com e sem ferimento em hastes de soja e avaliação do número de escleródios.....	24
4.2 Aplicação do método com ferimento na área experimental – 2 Etapas: Laboratório e Campo.....	25
4.2.1 Inoculação em folha destacada - 1º Etapa: Laboratório.....	25
4.2.2 Aplicação da metodologia com ferimento no terço médio da planta – 2º Etapa:campo.....	25
4.3 Determinação de metodologia de inoculação para a seleção de genótipos de soja resistentes à <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em condições de campo.....	27
4.3.1 Método de inoculação com e sem ferimento no primeiro internódio.....	30
4.3.2 Método de inoculação com e sem ferimento abaixo do último trifólio totalmente expandido.....	32
4.3.1 Avaliação de tecido não colonizado, após a inoculação de <i>S. sclerotiorum</i> por três métodos: corte, com e sem ferimento; e dos métodos com e sem ferimento abaixo do primeiro trifólio totalmente expandido.....	34
4.4. Inoculação de <i>S. sclerotiorum</i> por três métodos: Corte, sem e com ferimento.....	35
4.5 Métodos de inoculação realizando o corte e ferimento no caule principal entre o 4º e o 5º internódio (terço médio) na 1º avaliação.....	37

4.6 Métodos de inoculação realizando o corte e ferimento no caule principal entre o 4° e o 5° internódio (terço médio) na 2ª avaliação.....	38
5. Correlação de Spearman.....	39
5.1 Ranking das cultivares.....	39
5.2.1 Método de inoculação com e sem ferimento no primeiro internódio em condições de campo.....	40
5.2 Correlação entre os métodos de inoculação através do ranking das cultivares.....	40
5.2.2 Método de inoculação com e sem ferimento abaixo do último trifólio totalmente expandido em experimento conduzido em condições de campo.....	40
5.2.3 Inoculação de <i>S. sclerotiorum</i> por três métodos: corte, sem ferimento e com ferimento e segunda avaliação do corte.....	41
5.2.4 Avaliação de tecido não colonizado, após a inoculação de <i>S. sclerotiorum</i> por três métodos: corte, com e sem ferimento; e dos métodos com e sem ferimento abaixo do primeiro trifólio totalmente expandido.....	41
5.2.5 Métodos de inoculação realizando o corte e ferimento no terço médio das plantas na primeira avaliação (7DAI).....	42
5.2.5.1 Segunda avaliação (14DAI) dos métodos de inoculação realizando o corte e ferimento no terço médio da planta.....	42
5.2.6 Coeficientes de correlação do ranking médio das cultivares x metodologia.....	43
6. CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS.....	47
ANEXOS.....	57



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Tamanho da lesão de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em hastes de soja do primeiro experimento incubado em laboratório. UFU, Uberlândia, 2009.....	23
TABELA 2. Tamanho da lesão, número de escleródios e % de redução no progresso ou tamanho da lesão, inoculando-se plantas através de fermento e sem fermento do 2º experimento em laboratório. UFU, Uberlândia, 2009.....	24
TABELA 3. Reação de cultivares de soja à diferentes isolados de <i>S. sclerotiorum</i> pelo método da folha destacada. Uberlândia, 2009.....	26
TABELA 4. Tamanho de lesão causada por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> inoculadas em hastes de soja no terço médio, com auxílio de fermento realizado na área experimental. UFU, Uberlândia, 2009.....	28
TABELA 5. Tamanho médio de lesão provocado por quatro isolados em hastes de soja inoculadas pelo método com fermento no terço médio das plantas. UFU, Uberlândia, 2009.....	29
TABELA 6. Tamanho da lesão de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em hastes de soja inoculadas com e sem fermento no primeiro internódio, e incidência de plantas mortas em condições de campo. UFU, Uberlândia, 2009.....	31
TABELA 7. Tamanho da lesão em hastes de soja, quando utilizado o método de inoculação com e sem fermento abaixo do último trifólio totalmente expandido. UFU, Uberlândia, 2009.....	33
TABELA 8. Avaliação de tecido não colonizado, após a inoculação de <i>S. sclerotiorum</i> por três métodos: corte, com e sem fermento; e dos métodos com e sem fermento abaixo do primeiro trifólio totalmente expandido. UFU, Uberlândia, 2009.....	34
TABELA 9. Tamanho da lesão em hastes de soja inoculadas com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> por três métodos: corte, sem fermento e com fermento. UFU, Uberlândia, 2009.....	36
TABELA 10. Tamanho da lesão em hastes de soja 8 DAI com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> por três métodos: corte, sem fermento e com fermento UFU, Uberlândia, 2009.....	37
TABELA 11. Tamanho da lesão inoculada com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> através de duas metodologias: com fermento no terço médio e corte. UFU, Uberlândia, 2009.....	37

TABELA 12. Tamanho da lesão em hastes de soja inoculadas com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> por meio de duas metodologias: com ferimento no terço médio e corte na segunda avaliação. UFU, Uberlândia, 2009.....	38
TABELA 13. Ranking de 10 cultivares de soja dos experimentos conduzidos na área experimental, visando avaliar resistência à <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . UFU, Uberlândia, 2009.....	44
TABELA 14. Correlação do ranking das metodologias utilizadas para a seleção de genótipos resistentes à <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . UFU, Uberlândia, 2009.....	45

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Ciclo de vida de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> modificado do site White Mold Life Cycle da Universidade de Minnesota (2009).....	05
FIGURA 2. Sintoma de coloração marrom-clara, seguidas por micélio denso, e escleródios aderidos e no interior do caule.....	06
FIGURA 3. Folhas murchas decorrente da inoculação de <i>S. sclerotiorum</i> .....	06
FIGURA 4. Inoculação com discos de BDA contendo micélio de <i>S. sclerotiorum</i> em folíolos destacados de soja. UFU, Uberlândia, 2009.....	17
FIGURA 5. Escala diagramática para avaliação de sintomas de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em folhas inoculadas de plantas de soja (GARCIA, 2008).....	17
FIGURA 6. Inoculação pelo método do corte do caule e sem ferimento logo abaixo do meristema apical.....	20
FIGURA 7. Plantas de soja sendo avaliadas.....	21
FIGURA 8. Reações apresentadas pelas plantas inoculadas com <i>S. sclerotiorum</i> . (A) e (B) Plantas com raízes adventícias (C) Lesão marrom-avermelhada e (D) Folhas encarquilhas e sintomas do tipo carijó (E) Lesões enegrecidas.....	30
FIGURA 09. (A) Lesões marrom-avermelhadas (B) Plantas com ramificações secundárias.....	35
FIGURA 10. Lesão causada pela inoculação de <i>S. sclerotiorum</i> , abaixo e acima do local inoculado.....	38

## RESUMO

SAGATA, ERIKA. **Métodos de inoculação e avaliação da resistência de genótipos de soja à *Sclerotinia sclerotiorum***. UFU, 2010. 56p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia<sup>1</sup>.

A podridão branca da haste da soja causada por *Sclerotinia sclerotiorum* ocorre mais de um milhão de hectares no Brasil. Esta doença deve ser manejada por métodos de controle integrado, entre eles a resistência genética que deve ser pesquisada. O objetivo do trabalho foi avaliar e definir um método confiável na seleção de genótipos de soja. Quanto ao método de inoculação, o trabalho se baseou em avaliar inoculações realizadas no caule. As metodologias diferiram quanto ao local de inoculação na planta, uso ou não de ferimentos, ou o uso do corte do ápice das plantas na inoculação, utilizando o disco de BDA contendo micélio do fungo. Os testes foram conduzidos em dois ambientes distintos, em ambiente controlado, onde plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação e levadas para o laboratório para serem inoculadas e incubadas em câmara de crescimento onde a temperatura é extremamente favorável ao desenvolvimento do fungo e no campo onde a doença estará sujeita às condições ambientais adversas. Para definir qual o melhor método de inoculação, como também os genótipos que possuem maior resistência parcial, calculou correlações pelo coeficiente de Spearman entre os métodos avaliados e métodos com o ranking geral das cultivares. Observou-se que a temperatura, condições de cultivo, e o método de inoculação podem influenciar na seleção dos genótipos quanto à resistência à podridão da haste da soja. Definiu que o melhor método de avaliação à resistência de genótipos de soja foi a inoculação realizada com ferimento no terço médio da planta onde as plantas se encontravam no final do florescimento e início de enchimento dos grãos, com discos de BDA e avaliadas 14 dias após a inoculação, este método obteve  $r_s=0,86$ , e a cultivar que pode ser considerado com padrão de resistência em outros estudos foi a Emgopa 316, e o padrão de suscetibilidade a BRSMG Garantia e BRSMG 68 Vencedora.

**Palavras-chave:** Resistência, Métodos de inoculação, *Glycine Max* (L) Merrill, *Sclerotinia sclerotiorum*

<sup>1</sup>Comitê Orientador: Prof. Dr. Fernando Cezar Juliatti – UFU

## ABSTRACT

SAGATA, ERIKA. **Inoculation methods for *Sclerotinia sclerotiorum* and screening of soybean genotypes for soybean stem white rot.** UFU, 2010. 56p. Dissertation (Master's degree in Agriculture/Phytopathology) – Federal University of Uberlândia, Uberlândia<sup>1</sup>.

Soybean stem white rot, caused by *Sclerotinia sclerotiorum*, occurs in more than one million hectares in Brazil. This disease should be managed by integrated control methods, including genetic resistance. This study evaluated and developed a reliable method for the selection of soybean genotypes resistant to stem white rot. The work was based on rating inoculations on the stem. The methods evaluated consisted of different inoculation sites in the plant, wounding or not or cutting the stem of the plants, and inoculating PDA disks containing fungal mycelium. The tests were conducted in two different environments, a controlled one, where plants were grown in a greenhouse and brought into the laboratory to be inoculated and incubated in a growth chamber where the temperature is favorable for fungal growth, and a field, where the pathogen is subjected to adverse environment conditions. Spearman's coefficients of rank correlation was used to measure the correspondence between ranks of cultivar and ranks of the same cultivars in field experiments to establish the best inoculation method. It was observed that temperature growth conditions, and inoculation method may affect the selection of resistant soybean genotypes against stem rot. The best method to evaluate soybean resistance was by wound inoculating the middle third of the plant when the plants were at the end of flowering and early grain filling, with PDA disks and evaluating 14 days later. This method was  $r_s = 0.86$ , and the variety that can be considered as resistance standard in other studies was Emgopa 316, while the susceptible standards were BRSMG Garantia and BRSMG68 Vencedora.

**Keywords:** *S. sclerotiorum*, inoculation methods, soybean resistance

Supervisor: Prof. Dr. Fernando Cezar Juliatti – UFU

## 1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é a principal oleaginosa produzida no mundo, responsável por cerca da metade do óleo vegetal produzido e 20% do valor de exportações do agronegócio brasileiro (MORAES FILHO, 2007).

Atualmente, é a cultura mais plantada no Brasil, sendo que o primeiro levantamento de intenção de plantio para a cultura da soja no País indica um crescimento na área a ser plantada entre 2,6 e 4,2%, passando de 21.728,4 mil hectares plantados na safra 2008/2009, para um intervalo entre 22.283,1 e 22.648,1 mil hectares, correspondendo um aumento de área entre 554,7 mil hectares a 919,7 mil hectares (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2009).

Para o volume produzido, foi considerada a média da produtividade dos últimos cinco anos, descartando-se as safras atípicas e adicionando o avanço tecnológico. Dessa forma, estima-se uma produção entre 62,2 e 63,3 milhões de toneladas, representando um acréscimo de 5,18 à 6,19 milhões de toneladas, superiores à safra 2008/09 que foi de 57,1 milhões de toneladas (CONAB, 2009).

Entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos da soja estão as doenças. Aproximadamente quarenta doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus já foram identificadas no Brasil. A importância econômica de cada doença varia de ano para ano e de região para região, dependendo das condições climáticas de cada safra. As perdas anuais de produção devido a doenças são estimadas em cerca de 15% a 20%, entretanto, algumas doenças podem ocasionar perdas de quase 100% (KIMATI et al., 2005).

Na safra de 2007/2008, o que mais chamou a atenção dentre estas doenças foi a podridão branca da haste (*Sclerotinia sclerotiorum*), principalmente nos estados de Minas Gerais, devido a sua alta incidência nas áreas acima de 900 m (ZANETTI, 2009). Nas regiões sudoeste, leste de Goiás e entorno de Distrito Federal, as perdas foram de até 60% na produtividade (NUNES, JR., 2009). Na região de Chapadão do Sul (MS), o cultivo de girassol-safrinha está causando uma grande disseminação da doença comprometendo outras espécies susceptíveis, dentre elas a soja (PITOL, 2009).

Danielson e colaboradores (2004) estimaram perdas na produtividade de 83,2 a 229 kg ha<sup>-1</sup>, em quatro experimentos de campo e com 10% de incidência de podridão branca da haste.

Yang e colaboradores (1999) encontraram uma redução da produção de 170-335 kg ha<sup>-1</sup>, em Iowa; Chun e colaboradores (1987), de 257 kg ha<sup>-1</sup>, em Michigan, e Hoffman e colaboradores (1998) relataram redução da produção de 147-263 kg ha<sup>-1</sup>, em Illinois, para cada 10% de incidência.

De acordo com Tu (1989b), as alternativas viáveis de controle são: o tratamento químico de sementes, uso de cultivares resistentes, aumento de espaçamento e redução de densidade de planta. A rotação de cultura não seria eficiente pelo longo período de sobrevivência dos escleródios no solo.

No entanto, quando disponível a resistência do hospedeiro, é o método de controle mais confiável e mais econômico para o agricultor e o que menos afeta o meio ambiente, mas sua utilização no controle da podridão branca da haste é limitada pela total escassez e desconhecimento do germoplasma brasileiro.

Apesar da diferença varietal quanto à reação entre genótipos de soja já ter sido relatado na literatura, ainda pouco se sabe sobre estas reações no germoplasma brasileiro. Urge, também avaliar, um método adequado para a seleção do germoplasma de soja resistente à doença. Deste modo, este trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia adequada de inoculação para avaliar a reação de genótipos de soja quanto à resistência parcial à doença.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Etiologia, Epidemiologia e Ciclo de vida

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é o agente causador da podridão branca da haste da soja. As doenças causadas pelo patógeno recebem diferentes denominações em outros hospedeiros, entre elas: mofo branco, podridão da cabeça, podridão aquosa e podridão da haste (PURDY, 1979) e pertence à subdivisão Ascomycota, classe Leotimycetes, ordem Helotiales e Família Sclerotiniaceae (CABI, 2008).

Este fitopatógeno pode sobreviver no solo por mais de 10 anos, através de estruturas de resistência conhecidas como esclerócio ou escleródio. Estas estruturas apresentam formato irregular, com um a vários milímetros de diâmetro e comprimento (KIMATI et al., 2005); a princípio apresentam coloração branca, e posteriormente, tornam-se negros e duros. O escleródio é formado por uma massa compactada e melanizada de micélio e, após a sua germinação, é geralmente o responsável inicial pela infecção da planta cultivada (AGRIOS, 1997).

*Sclerotinia sclerotiorum* é um patógeno que causa danos em muitas plantas de interesse econômico, sendo que Boland e Hall (1994) relacionaram 408 espécies como hospedeiras do patógeno. Este patógeno está disseminado por diversos países em todo o mundo (LUMSDEN, 1979; PURDY, 1979), e seus danos manifestam-se com maior severidade em áreas com clima úmido, associado à alta umidade relativa.

No Brasil, tem se tornado importante devido a recentes epidemias ocorridas na cultura da soja, principalmente em regiões onde ocorrem condições climáticas amenas na safra de verão (Região Sul, chapadas dos cerrados, acima de 800m de altitude) ou mesmo, em anos de ocorrência de chuvas acima da média (EMBRAPA 2009; LEITE, 2009).

A fase mais vulnerável da planta vai do estágio da floração plena ao início da formação das vagens. Altas umidades relativas do ar e temperaturas amenas favorecem o desenvolvimento do fungo (EMBRAPA, 2009).

Escleródios caídos no solo, no período de 4 à 12 semanas (PRATT, 1991), sob umidade contínua de cerca de 10 dias no solo (ABAWI; GROGAN, 1979), temperaturas entre 10°C e 21°C, germinam e desenvolvem apotécios na superfície do solo, mas existem outros autores afirmando que a temperatura ótima estaria entre 8 a



16°C (DILLARD et al., 1995); estes produzem ascosporos que são liberados ao ar e são responsáveis pela infecção das plantas (KIMATI et al., 2005).

Cada apotécio contém centenas de ascos de forma cilíndrica e em cada asco há oito ascosporos, que são ovóides e apresentam de 4 a 10 µm de largura e 9 a 16 µm de comprimento. O apotécio libera ascosporos continuamente por 2 a 17 dias, com uma média de 9 dias. A produção máxima de ascosporos ocorre em um intervalo de 2 a 3 dias entre o quarto e nono dia de vida ativa do apotécio. O total de ascosporos produzidos por um apotécio atinge um valor em torno de dois milhões (SCHWARTZ; STEADMAN, 1978).

Os ascosporos de *S. sclerotiorum* são a fonte primária de inóculo e podem sobreviver mais de 7 meses a baixa umidade e germinam a potenciais osmóticos bem baixos. A germinação dos ascosporos ocorre na presença de alta umidade relativa e temperatura ótima entre 5 a 10°C, enquanto a temperatura ótima para crescimento micelial está na faixa de 15 a 25°C (ABAWI; GROGAN, 1975; DOMSCH et al., 1980).

*S. sclerotiorum* requer uma fonte exógena de energia para que os ascosporos infectem as folhas, vagens ou hastes (ABAWI; GROGAN, 1975; DOMSCH et al., 1980; STEADMAN, 1983). Adicionalmente, a infecção ocorre via geral, diretamente através da cutícula, com a formação de apressórios, exceto quando a penetração ocorre via estômatos em alguns hospedeiros.

Jamaux e colaboradores (1995), em seu estudo com flores de colza, observaram a formação de pequenos tubos germinativos, sem formação de apressórios, no entanto, em folhas infectadas por flores colonizadas de micélio, a penetração ocorreu via estômatos.

Lumsden e Wegin (1980 apud Jamaux et al.1995), em estudo com feijão, a *S. sclerotiorum* tem sido penetrado pela cutícula foliar, diretamente através de apressórios.

A disseminação de *S. sclerotiorum* ocorre por meio de esclerócios misturados às sementes ou através de micélio dormente (KIMATI et al., 2005). Os esclerócios podem germinar e provocar dois tipos de infecção. São elas:

- a) miceliogênica, na qual o micélio germina de esclerócios no solo e coloniza o colo e as raízes da planta;
- b) carpogênica, quando apotécios se originam dos esclerócios e produzem ascosporos, que irão atingir a parte aérea. O micélio então invade as células e os espaços intercelulares, podendo alcançar o sistema vascular (LUMSDEN, 1979).

Na Figura 01, temos o ciclo da doença que se completa com a formação de novos esclerócios.

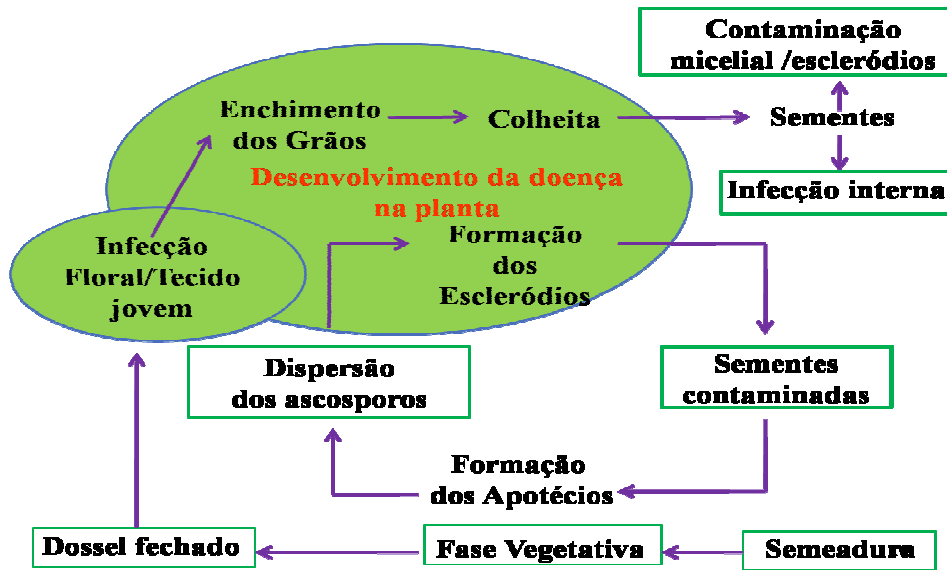


FIGURA 1. Ciclo de vida de *Sclerotinia sclerotiorum* modificado do site White Mold Life Cycle da Universidade de Minnesota (2009).

A colonização ocorre associada à liberação de enzimas capazes de degradar a parede celular das células hospedeiras. Acredita-se que a enorme variedade de celulases, hemicelulases e pectinases produzidas por este fungo sejam um dos fatores que contribuem para a sua falta de especificidade (RIOU et al., 1991).

O ácido oxálico e enzimas pectolíticas estão associados com o desenvolvimento do mofo branco causado por *S. sclerotiorum*. O ácido oxálico penetra no tecido ao redor da lesão, reduzindo o pH de aproximadamente 6,8 para 4,0 e fornece um pH ótimo para a ação da enzima pectolítica (ECHANDI; WALKER, 1957; MARCIANO et al., 1983; MAXWELL; LUMSDEN, 1970;) e enfraquece as paredes celulares via quelação do pectato de cálcio e inibição da Teta-difenol oxidase (FERRAR; WALKER, 1993).

A produção de ácido oxálico também está relacionada com a virulência de *S. sclerotiorum*. Isolados fúngicos hipovirulentos produzem menos micélio e ácido oxálico em comparação com isolados virulentos (ZHOU; BOLAND, 1999). O ácido oxálico tem se mostrado um importante fator de patogenicidade e, utilizando mutantes de *S. sclerotiorum*, houve deficiência na produção de ácido oxálico (GODOY et al.1990).

Apesar de ainda não se conhecerem seus mecanismos exatos de ação, o ácido oxálico, além de propiciar um pH adequado para ação de suas enzimas, interfere com a produção de ácido abscísico e desregula as células-guarda dos estômatos, provocando a

murcha das folhas, e pode ser diretamente tóxico às plantas, enfraquecendo suas defesas e suprimindo a explosão oxidativa (CESSNA et al., 2000; GUIMARÃES; STOTZ, 2004).

## 2.2 Sintomatologia

Os primeiros sintomas são manchas de anasarca que evoluem para coloração castanho-clara (Figura 2) e logo desenvolvem abundante formação de micélio branco e denso. Em poucos dias, o micélio transforma-se em uma massa negra, rígida (Figura 2), denominada escleródio, que é a forma de resistência do fungo. Os escleródios variam em tamanho de poucos milímetros a alguns centímetros e são formados tanto na superfície como no interior da haste e das vagens infectadas. Ocasionalmente, nas folhas, podem ser observados sintomas de murcha e seca (Figura 03). (EMBRAPA 2009; KIMATI et al., 2005).



FIGURA 2. Sintoma de coloração marrom-clara, (Sagata, 2009), seguidas por micélio denso, e escleródios aderidos e no interior do caule (Henning, 2005).



FIGURA 3. Folhas murchas decorrente da inoculação de *S. sclerotiorum*

### 2.3 Controle

O controle da podridão branca é difícil devido à permanência de escleródios viáveis por um longo período no solo. E o controle mais efetivo baseia-se num programa integrado de medidas, que incluem práticas culturais: A Embrapa (2009) sugeriu evitar a introdução do patógeno na área, utilizando sementes certificadas e livres do patógeno.

Assim, em campos de produção de sementes, caso a doença esteja distribuída de maneira generalizada, condenar o campo para a produção de sementes; porém se a doença estiver localizada em baixadas, deixar 15 metros de bordadura, colhendo apenas o restante do campo para semente; acompanhar o beneficiamento da semente passando pela pré-limpeza (máquinas de ar e peneira), separador espiral (imprescindível para remover os esclerócios) e finalmente pela mesa de gravidade ou densimétrica. Se, durante o exame de pureza, no laboratório, for constatada a presença e um esclerócio em 500g de semente, o lote deverá ser condenado como semente (EMBRAPA, 2009).

As sementes provenientes de campos suspeitos ou com a presença de mofo branco devem obrigatoriamente ser tratadas com mistura de fungicidas contendo benzimidazóis (thiabendazole, carbendazin ou tiofanato metílico). Em áreas de ocorrência da doença, fazer a rotação/sucessão de soja com espécies não hospedeiras como milho, aveia branca ou trigo; eliminar as plantas hospedeiras do fungo; fazer adubação adequada; aumentar o espaçamento entre linhas, reduzindo a população ao mínimo recomendado, para evitar o acamamento e facilitar a ventilação e a penetração dos raios ultravioletas no solo, que diminuem a incidência do mofo branco (EMBRAPA, 2009).

O controle químico dessa doença tem apresentado diferenças de eficiência e algumas vezes resultados contraditórios, sendo o seu sucesso resultado da fungitoxicidade do produto, dose, época, volume e equipamento de aplicação, cultivar, espaçamento de plantas e incidência e severidade da doença (GASPAROTTO, 1980; VIEIRA, 1994).

Para a cultura da soja, o único produto registrado para o controle de mofo branco é o tiofanato metílico, aplicados curativamente ou mesmo utilizado no tratamento de sementes.

Na busca por técnicas menos agressivas no manejo da doença, muitos trabalhos tem dirigido a atenção para o controle biológico.

*Coniotyrium minitans* é considerado o mais importante parasita de escleródios de *S. sclerotiorum*. Outros parasitas como *Rhizopus stolonifer*, *Gliocladium roseum*, *Trichotecium roseum*, *Trichoderma viride* e *Bacillus subtilis* também inibem o crescimento micelial, a viabilidade dos escleródios ou a sua formação (ADAMS; AYRES, 1979; DOMSCH et al., 1980).

O gênero *Trichoderma* constitui hoje o grupo de agentes de biocontrole de fungos fitopatogênicos mais estudado. O rápido crescimento micelial, a alta produção de conídios, a síntese de diversos antibióticos e a capacidade de viver de diversas formas (saprotrófica, simbiote ou micoparasita) são características que o tornam atraente para esse fim. Este gênero está distribuído mundialmente, com algumas espécies restritas geograficamente e outras se apresentando como cosmopolitas. Dentre estas espécies, *T. harzianum* é a que apresenta o maior número de indivíduos e a maior disseminação (SAMUELS, 2006).

As interações com a planta são apenas um dos diversos mecanismos de controle de doenças por *Trichoderma*, que também se apresenta como um ótimo competidor por espaço, oxigênio, água e nutrientes, restringindo o desenvolvimento de outros microrganismos pela falta destes (MELO, 1996). Além disso, pode alterar o pH do solo, por meio da secreção de ácidos orgânicos, o que afeta a atividade de outros microrganismos, além de inibir a produção de fatores de virulência (BENÍTEZ et al., 2004).

Trutmann (1985) relata que *C. minitans* e *Sporidesmium sclerotivorum* são importantes hiperparasitas de *S. sclerotiorum*, e que a combinação do tratamento biológico no solo, após a colheita com o enterrio profundo dos restos culturais, pode ser viável dentro do controle integrado do patógeno. A estratégia proposta inclui o uso de pulverizações com fungicidas durante o cultivo e a aplicação de suspensão de esporos de *C. minitans* em restos picados de cultura e o subsequente enterrio por aração profunda.

## **2.4 Resistência genética**

A resistência de cultivares de soja à *S. sclerotiorum* tem sido avaliada em condições de campo, casa-de-vegetação e laboratório, sendo observadas respostas que variam desde elevada resistência até completa suscetibilidade (BOLAND; HALL, 1987; WEGULO et al., 1998).

O relato da resistência de cultivares de soja seria conferido muitas vezes, pelo simples fato do escape da infecção das flores ocorrer antes da esporulação do patógeno (GRAU, 1988), ou mesmo, pela arquitetura da planta mais aberta, ereta, que reduz o micro-clima e permite a circulação de ar no dossel, promovendo o rápido secamento das superfícies da folha e solo, e facilitando a circulação do ar e penetração de luz, o que reduz a infecção das plantas (COYNE et al., 1974).

Em muitas plantas, incluindo soja, a resistência genética completa não existe (CALLA, et al., 2009).

A resistência fisiológica de feijão (*Phaseolus vulgaris*) à *S. sclerotiorum* é herdada poligenicamente (FULLER et al., 1984) e evidências preliminares indicam que pode ser herdada da mesma forma na soja (PENNYPACKER; RISIUS 1999).

A resistência fisiológica na soja para *S. sclerotiorum* foi observada em experimentos de casa-de-vegetação e de câmara de crescimento. Ela é caracterizada por lesões de coloração marrom-avermelhadas limitadas ao sítio da inoculação (BOLAND; HALL, 1986; CLINE; JACOBSEN, 1983; PENNYPACKER; HATLEY, 1995; GRAU, 1988). No entanto, é difícil de demonstrar no campo, devido à propensão das plantas em escapar da infecção (NELSON et al., 1991a).

A triagem destes materiais evitaria este problema, conduzindo os experimentos em casas-de-vegetação e laboratórios, mas há pouca correlação entre os resultados de campo e os das condições controladas (BOLAND; HALL, 1987).

A falta de correlação aumenta a evidência de trabalhos prévios, sugerindo que, em testes em casas-de-vegetação/laboratórios, é indesejável para ser um método confiável de identificação de resistência no campo (RUSSEL, 1978).

A resistência de 23 cultivares de soja a *S. sclerotiorum* foi avaliada em campo naturalmente infestado, por Grau e colaboradores (1982). Todas as cultivares com flores brancas foram relativamente suscetíveis, e algumas cvs. com flores púrpuras foram menos suscetíveis, no entanto, esta relação não foi verificada em trabalhos realizados por Garcia (2008).

A resistência ou suscetibilidade ao patógeno não foi relacionada à arquitetura de planta ou grupo de maturação da soja. Para os autores, persiste a dúvida se a resistência ao patógeno é expressa quando as flores são infectadas por ascospores do patógeno (GRAU et al., 1982).

Trabalhos conduzidos por diversos autores identificaram cultivares com resistência parcial à *S. sclerotiorum* em avaliações de campo, e que são utilizadas como padrões, dentre elas Corsoy, Corsoy 79, Hodgson 78 e Syngenta S19-90 (GRAU; RADKE, 1984; KIM; DIERS, 2000; KIM et al., 2000; WEGULO et al., 1998; YANG et al., 1999), além destas cultivares, Hoffman e colaboradores (2002) identificaram diversos PIs com elevada resistência: 153.282, 189.931, 196.157, 398.367, 417.201, 423.818, e PI 561.331.

Os melhoristas consideram que a estabilidade e a menor interação genótipo x ambiente das cultivares sejam um dos importantes aspectos na manutenção da produtividade em diferentes ambientes e a seleção de materiais resistentes às doenças seja um dos parâmetros de seleção na estabilidade desta produtividade (HEINRICH et al., 1983).

Contudo, a resistência a doenças é sensível a fatores ambientais como a luz e a temperatura, podendo confundir os melhoristas na escolha de materiais com alta estabilidade e adaptabilidade. A resistência poligênica em alfafa à *Verticillium albo-atrum* é sensível a níveis de luz e a soja parece ser mais suscetível, quando estiolados pela luz deficiente ao *S. sclerotiorum*, que as plantas não estioladas (CLINE; JACOBSEN, 1983; BOLAND; HALL, 1987; CHUN et al., 1987; PENNYPACKER et al., 1994).

Trabalhos posteriores de Pennypacker e Risius (1999) verificaram que a soja apresentou sensibilidade do ambiente relacionada a temperatura e a intensidade luminosa, utilizando-se de fluxos de fótons da radiação ativa fotossintética, durante o período de inoculação de 48 horas .

Garcia (2008) utilizou o método de folhas destacadas e o genótipo Emgopa 316 apresentou maior resistência ao patógeno. Estes resultados sugerem que a penetração do patógeno não deve ser apenas floral. Tecidos vegetais jovens, flores e fragmentos de flores são base nutritiva para o início da colonização por ascósporos do fungo, por possuírem altas concentrações de alfa-celulose. (SUTTON; DEVERAL, 1983).

Kim e Diers (2000), em uma população derivada da hibridização entre Novartis S19-90 e Williams 82, mapearam três Loci Trait Quantitative (QTL), controlando a resistência à podridão da haste da soja. Dois dos três loci foram significativamente associados a data de florescimento ou altura da planta e o acamamento, indicando que estes loci contribuem para a resistência através do escape da doença. O terceiro QTL

não foi associado ao mecanismo de escape, indicando que talvez seja um gene que contribua para a resistência fisiológica.

Alguns pesquisadores têm utilizado o ácido oxálico para a identificação de cultivares resistentes ao patógeno. Wegulo e colaboradores (1998) testaram inúmeros métodos de inoculação em casas-de-vegetação, incluindo inoculação micelial de folhas, caules e folhas destacadas, e a resposta de caules destacadas ao ácido oxálico. Eles demonstram que a inoculação de folhas destacadas, níveis de pigmentação do caule na solução de ácido oxálico, tem maior correlação com resultados do campo, embora a repetibilidade dos experimentos seja baixa e as correlações moderadas (0,44-0,55).

Kim e colaboradores (2000) e Wegulo et al. (1998) disseram que são necessários métodos mais precisos realizados em laboratórios e casas-de-vegetação para identificar materiais resistentes em condições de campo.

Em outros estudos, Tu (1989a) distinguiu variedades de feijão tolerantes e suscetíveis, com base nas diferenças na taxa de difusão do ácido oxálico no tecido foliar. Noyes e Hancock (1981) desenvolveram esta técnica em folhas de girassol, portanto, as diferenças na tolerância a ácido oxálico e/ou resistência a sua difusão no tecido do hospedeiro pode resultar em regiões de encharcamento variáveis ao redor das lesões.

Uma estratégia de defesa contra a *S. sclerotiorum* pesquisada por Cober e colaboradores (2003) é o uso de uma soja transgênica que produz uma enzima que degrada o ácido oxálico. Os autores verificaram que sojas transgênicas homozigotas do Gene OxO apresentaram progressão da doença e extensão da lesão extremamente reduzida, quando inoculadas.

#### **2.4.1 Métodos de inoculação utilizados para seleção de genótipos resistentes à *S. sclerotiorum***

Várias formas de inóculo podem ser usadas para iniciar a infecção de *Sclerotinia* spp. em plantas. A escolha de uma forma de inóculo e método de inoculação dependem da morfologia e estágio de crescimento da planta hospedeira, da precisão de informação, e da extensão em que a infecção natural deve ser simulada. Formas simples de inóculo incluem discos de colônias de ágar e micélio de colônias líquidas. Substratos orgânicos como vagens de feijão, discos de cenoura e pequenos grãos são autoclavados



com água e infestados com discos de ágar. Ascosporos e escleródios também podem ser usados como inóculo em casa-de-vegetação e campo (PRATT, 1991).

O inóculo comumente é aplicado em folhagem, caules e botões florais para determinação da patogenicidade. Pode ser aplicado nos internódios de hastes ou axilas das folhas, ou sobre partes aéreas inteiras de plantas. Amendoim e soja podem ser inoculados com discos de ágar no colo da planta, e girassol e alface podem ser inoculados similarmente com escleródios individuais nos caules baixeiros ou raízes superiores. Ferimentos por picadas podem ser exigidos nos sítios de inoculação para uma infecção eficiente com essas técnicas. Ascosporos de *S. sclerotiorum* em suspensão ( $2000 \text{ ml}^{-1}$ ) podem ser pulverizados em plantas inteiras no estágio suscetível de florescimento (PRATT, 1991).

Após qualquer forma de inoculação, deve ser mantida alta umidade por pelo menos 24-72 horas. Partes inoculadas podem ser cobertas com sacos plásticos, com excesso de umidade, para prevenir o secamento. As temperaturas favoráveis para inoculação são 20-25°C, para *S. sclerotiorum* (PRATT, 1991).

Partículas de micélio seco de *S. sclerotiorum* foram utilizadas com sucesso para a inoculação de raízes de plantas de alface, antes do transplante. Seguidos 6 dias do transplante, 100 % das mudas inoculadas apresentavam-se mortas (LOCH; D'AVILA, 1994).

Uma técnica relativamente sensível para comparar interações de feijão *S. sclerotiorum* refere-se a “inoculação de período-limitado”, desenvolvida por Hunter e colaboradores (1981). O procedimento envolve a remoção precoce de inóculo (24 horas após a aplicação em sítio específico) para reduzir a severidade da doença e melhor revelar a resistência parcial que é superada com períodos mais longos de incubação. Este método, com algumas modificações, foi usado com sucesso para avaliar interações de *S. sclerotiorum* e soja (BOLAND; HALL, 1986; CLINE; JACOBSEN, 1983).

Um método simples que não requer plantas em florescimento foi utilizado por Leone e Tonneijck (1990) para selecionar cultivares de feijoeiro a *S. sclerotiorum* e *Botrytis cinerea*. Folhas primárias destacadas foram pulverizadas com uma suspensão de ascosporos, sendo necessária a adição de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ou de misturas de fosfato inorgânico e glicose ao inóculo para estimular a patogenicidade. A concentração de esporos influenciou na produção de lesões ( $2 \times 10^6$  esporos  $\text{ml}^{-1}$  foi melhor que  $2 \times 10^5$ ).

Cline e Jacobsen (1983) inocularam as flores por aspersão com ascósporos. Eles observaram alta incidência da doença, mas não obtiveram diferenças significativas entre as cultivares. O uso de ascósporos como um método de inoculação na avaliação de cultivares de soja para resistência a *S. sclerotiorum*, em condições controladas de ambiente, é demorado porque exige o pré-condicionamento para a germinação carpogênica de escleródios (COOLEY-SMITH; COOK, 1971; COSTA; COSTA, 2006; DILLARD et al., 1995) e à recolha e armazenamento de ascósporos.

O método de inoculação de caules foi empregado para avaliar genótipos de alfafa a *S. sclerotiorum* e *S. trifoliorum* (AUNG et al., 1994; PRATT; ROWE, 1991). Esta técnica, utilizando repetidas inoculações nas hastes de cada planta, apresentou uma variabilidade nas respostas de diferentes hastes inoculadas na mesma planta, requerendo várias repetições na avaliação para mostrar diferenças entre os materiais testados.

Extensivamente, ensaios de campo para avaliar a resistência a *S. sclerotiorum* tem sido reportado, mas várias técnicas e seleções em ambientes controlados não têm tido consistência com as reações a campo, tanto para soja, como para feijão, isto é devido, em parte pela variabilidade na agressividade do isolado (KULL et al., 2003).

Chun e colaboradores (1987) descreveram um teste em que a inoculação foi feita em hastes de soja cortadas e incubadas em substrato, através da qual foi possível identificar diferenças entre variedades. As correlações com dados de campo variaram de experimento a experimento. No mesmo trabalho, as respostas quanto à resistência à *S. sclerotiorum* não correlacionaram com os grupos de maturidade 0, I, II, e III, apesar do grupo 0 apresentar menos doença. Grau e colaboradores (1982) também não encontram nenhuma relação com os grupos de maturidade e a resistência.

Segundo Nelson e colaboradores (1991a, 1991b), este método oferece, em condições de laboratório, rapidez, economia e confiabilidade, porém os autores sugerem que seu valor, para programas de melhoramento, seja limitado, em virtude da falta de correlação com os dados de campo.

O ensaio de folhas destacadas foi utilizado por Pratt e Rowe (1998) para inocular alfafa, folhas com *S. trifoliorum*, e em folhas de soja, por Chun e colaboradores (1987), Kim e colaboradores (2000), Kull e colaboradores (2003), Nelson (1991a), Wegulo (1998), Chun e colaboradores (1987); Garcia (2008), entre outros.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micologia e Proteção de Plantas – LAMIP da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e na área experimental do Instituto de Ciências Agrárias da UFU.

#### 3.1 Obtenção dos isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*

Seis isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* foram obtidos de escleródios formados no interior da haste de soja, provenientes de campos comerciais de Jataí (GO), Campo Alegre (GO), Romaria (MG), Patos de Minas (MG) e Uberlândia (MG), cujo isolado é denominado por ABC, pois foi coletado na Fazenda Canadá do Grupo ABC, e um isolado proveniente de sementes de girassol, da mesma cidade.

Os escleródios foram previamente desinfestados em álcool 50% e água sanitária a 0,5% diluída em água destilada estéril, nos tempos de 30 e 60 segundos, respectivamente. Posteriormente, os escleródios foram enxaguados em água destilada estéril e transferidos para placas de Petri contendo meio BDA (batata, dextrose e Agar).

As placas de Petri foram incubadas a  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas para germinação miceliogênica até a formação de escleródios.

A obtenção de discos de micélio para os ensaios foram sempre provenientes de escleródios.

#### 3.2 Inoculações no caule realizados no laboratório – 2 Etapas: Casa-de-vegetação e laboratório

##### 3.2.1 Método de inoculação com e sem fermento em hastes de soja

###### 3.2.1.1 1ª Etapa: Casa-de-vegetação

As plantas utilizadas foram cultivadas em copos plásticos de 500 ml contendo solo misturado com substrato Plantmax, na proporção de 2:1 e em ambiente de casa-de-vegetação.

Nesta etapa, foram conduzidos dois experimentos em duas condições de cultivo diferenciados e em períodos diferentes.

**1º experimento:** foram testadas 12 cultivares, em esquema de delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, onde cada planta foi considerada uma repetição.

No dia 10/02/2009, foram semeadas duas sementes por pote e após dez dias da semeadura foi realizado o desbaste para uma planta por copo, sendo que a inoculação ocorreu quando as plantas se encontravam no estágio V<sub>4</sub>-V<sub>5</sub>.

**2º experimento:** As plantas foram semeadas no dia 06/04 e no desbaste foram deixadas três plantas por copo, sendo que as plantas foram inoculadas quando as plantas já se encontravam no estágio V<sub>5</sub>-V<sub>6</sub>.

Foram testadas 14 cultivares, em esquema de delineamento inteiramente casualizado, com sete repetições, onde cada planta representou uma repetição.

### **3.2.1.2 2º Etapa: Laboratório**

No momento da inoculação, as plantas foram levadas para o Laboratório de Micologia e Proteção de Plantas da Universidade Federal de Uberlândia.

Após a inoculação das plantas, estas foram incubadas à temperatura de  $22 \pm 3^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas.

O isolado preliminar utilizado nos dois experimentos foi o isolado de Jataí, já descrito por Garcia (2008).

**1º experimento:** Com auxílio de estilete, ferimentos foram feitos entre o 2-3º internódio das plantas e posteriormente foi realizada a inoculação com disco de micélio de seis mm de diâmetro de cinco dias de idade, fixados por fita adesiva durex no local do ferimento.

**2º Experimento:** Neste experimento foram testados dois métodos de inoculação: método de inoculação com ferimento e sem ferimento no caule, entre o 3-4º internódio, procedendo-se da mesma maneira descrita acima.

### **3.2.1.3 Avaliação**

**1º Experimento:** três dias após a inoculação (DAI), mensurou-se o tamanho da lesão causada pela *S. sclerotiorum*.

**2º experimento:** o mesmo procedimento da avaliação descrita acima foi realizado quatro DAI, com auxílio de uma régua.

Além de avaliar o tamanho da lesão, 21 DAI, foi quantificado o número de escleródios de cada planta inoculada.

#### **3.2.1.4 Teste estatístico**

Os dados foram submetidos à análise de variância, aplicando-se o teste de Scott-Knott, à 5% de significância, por meio do software SISVAR (FERREIRA, 2000), para todos os experimentos que se seguem.

As médias do segundo experimento foram transformadas em raiz quadrada de x mais 0,5.

### **3.3 Aplicação da metodologia com ferimento em condições de campo – 2 Etapas: Laboratório e Campo**

O experimento foi instalado no dia 08/05, na Área Experimental pertencente ao Instituto de Ciências Agrárias, no bairro Umuarama, Uberlândia – MG.

O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados em esquema de parcelas subdivididas, no qual foram comparados: 18 cultivares (parcela) e quatro isolados (subparcela), em quatro blocos casualizados.

Em cada parcela, a semeadura foi realizada no espaçamento com entrelinhas de 20 centímetros (cm), com população de 15 plantas por metro (m), sendo que cada isolado foi inoculado em 10 plantas.

#### **3.3.1 Inoculação em folha destacada - 1º Etapa: Laboratório**

Quando as plantas atingiram o estágio V<sub>3</sub>, o folíolo central de três plantas, escolhidas aleatoriamente e correspondentes ao 2º trifólio, foi coletado e levado ao laboratório para montagem do experimento.

Três folíolos foram colocados em caixas de gerbox, separadamente, contendo quatro folhas de papel toalha umedecidas em água destilada estéril (Figura 4). Antes da inoculação, os folíolos foram borrifados com água e a seguir receberam um disco de

micélio de 6mm, com cinco dias de idade. As caixas gerbox contendo os folíolos foram incubadas à temperatura de  $22 \pm 3^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas, durante 72 horas.



FIGURA 4. Inoculação com discos de BDA contendo micélio de *S. sclerotiorum* em folíolos destacados de soja. UFU, Uberlândia, 2009. Fonte: Sagata (2009).

### 3.3.1.1 Avaliações

As avaliações foram realizadas 72 horas após a incubação, com base em escala diagramática elaborada por Garcia (2008), através do Programa Quant da UFV (VALE et al., 2003).

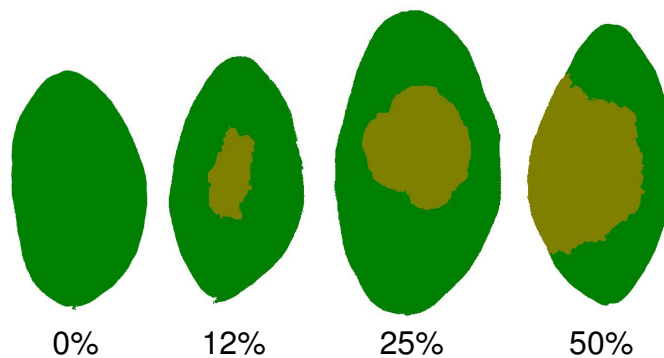


FIGURA 5. Escala diagramática para avaliação de sintomas de *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas inoculadas de plantas de soja (GARCIA, 2008).

Com base na severidade da doença (Figura 5), os genótipos foram classificados em imunes (ausência da doença), resistentes ( $R=0$  a 11%), moderadamente resistentes ( $MR=12$  a 24%), moderadamente suscetíveis ( $MS=25$  a 50 suscetíveis) e suscetíveis ( $S>50\%$ ) (GARCIA, 2008).

### **3.3.2 Inoculação com fermento no terço médio da planta - 2º Etapa: Campo**

No momento da inoculação, as cultivares se encontravam no seguinte estágio fenológico: R<sub>3</sub>-R<sub>4</sub> (M-SOY 2002, M-SOY 8008 e M-SOY 8352, M-SOY 8001, Emgopa 316, M-SOY 8000); R<sub>2</sub> (Pioneer, MG/BR 46 Conquista, M-SOY 8360, BRSMG 68 Vencedora, BRS Favorita RR, UFUS-Tikuna); V<sub>8</sub>-V<sub>10</sub> (M-SOY 8527, UFUS-Capim Branco, UFUS-Carajás, UFUS-Guará, UFUS-Impacta, UFUS-Mineira ).

A inoculação foi realizada com disco de micélio de seis mm de diâmetro e com cinco dias de idade e foram fixados por fita adesiva durex nas hastes entre o 4º-5º internódio. Todas as plantas foram picadas com estilete.

Para o molhamento das plantas no campo, foi feita a irrigação de dois mm dia<sup>-1</sup> após a inoculação, sendo este procedimento executado em períodos mais quentes do dia, até o momento da avaliação.

#### **3.3.2.1 Avaliação**

Quatro dias após a inoculação (DAI), foram mensuradas, com auxílio de uma régua, lesões causadas pela inoculação com *Sclerotinia sclerotiorum* na haste.

### **3.4 Determinação de metodologia de inoculação para a seleção de genótipos de soja resistentes à *Sclerotinia sclerotiorum* em condições de campo**

Os próximos experimentos/metodologias de inoculação foram conduzidos na área experimental da UFU, instalados no dia 14/10.

A partir do teste realizado no campo, no mês de maio, das 18 cultivares, escolheram-se as 5 mais resistentes e as 4 mais suscetíveis, daquelas que tiveram disponibilidade das sementes.

Foram realizadas várias inoculações, com diversas metodologias ao longo do desenvolvimento da cultura. O isolado utilizado foi o de Girassol, que segundo a metodologia de folhas destacadas, apresentou maior agressividade.

A inoculação foi realizada com disco de micélio de seis mm de diâmetro e com 5 dias de idade, fixados por fita adesiva durex.

Logo após o procedimento das inoculações nas plantas, quando necessário, foram realizadas irrigações visando manter o ambiente úmido.

O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados em esquema de parcelas subdivididas, no qual foram comparados: dez cultivares e (x) metodologias, em quatro blocos casualizados.

Em cada parcela, a semeadura foi realizada no espaçamento de 45 centímetros (cm), numa população de 12 plantas por metro (m), e em cada método avaliado foram inoculadas 10-12 plantas.

#### **3.4.1 Método de inoculação com e sem ferimento no primeiro internódio**

A inoculação foi realizada no dia 12/11, quando as plantas se encontravam no estágio entre V<sub>4</sub>-V<sub>5</sub>.

Dois métodos foram testados: método de inoculação no caule, provocando ferimentos com estilete, e o segundo método de inoculação no caule, sem ferimento, entre a folha unifoliolar e o primeiro trifólio.

Avaliou-se o tamanho da lesão causada pela *S. sclerotiorum* e a incidência de plantas mortas, quatorze DAI.

Neste período, a precipitação média foi de 2,19 mm dia<sup>-1</sup>, com temperatura média máxima de 31°C e mínima de 21,8°C, sendo que somente no segundo DAI houve precipitação média de 17 mm dia<sup>-1</sup>.

Devido ao longo período de estiagem, foram necessárias irrigações freqüentes de dois mm dia<sup>-1</sup>, em horários alternados.

Os dados foram submetidos à ANAVA, aplicando-se o teste de Scott-Knott, a 5% de significância, e as médias transformadas pela raiz de x + 0,5.

#### **3.4.2 Método de inoculação com e sem ferimento abaixo do primeiro trifólio totalmente expandido**

A inoculação foi realizada no dia 20/11. As plantas estavam no estágio entre V<sub>6</sub>-V<sub>7</sub> e a M-SOY 2002 no estágio R<sub>1</sub>. No quarto DAI, foi realizada a avaliação do tamanho da lesão.



Não houve precipitação nos quatro dias seguintes após a inoculação e a temperatura média máxima foi de 30,86°C e mínima de 21,96° C.

Foram necessárias irrigações durante este período. Para tanto, utilizou-se uma lâmina de água de dois mm dia<sup>-1</sup>.

O disco de micélio foi fixado no internódio logo abaixo da folha trifoliada aberta, nos dois métodos de inoculação na haste de soja: com ferimento e sem ferimento.

### **3.4.3 Inoculação de *S. sclerotiorum* por três métodos: corte do caule, sem ferimento e com ferimento**

Três métodos foram testados: inoculação na haste com e sem ferimento, no internódio logo abaixo do meristema apical.

No método de inoculação corte, o caule principal das plantas foi horizontalmente cortado com uma lâmina no nó do último trifólio totalmente expandido (Figura 6), e um disco de micélio foi colocado sobre o caule cortado e fixado por fita adesiva durex.

A inoculação foi realizada no dia 28/11 e as plantas se encontravam no estágio entre V<sub>9</sub>-V<sub>10</sub> (BRSMG Garantia e M-SOY 8527, BRS Favorita RR, M-SOY 8000), R<sub>1</sub> (MG/BR 46 Conquista, M-SOY 8001, BRSMG 68 Vencedora, M-SOY 8352) e R<sub>2</sub> (Emgopa 316, M-SOY 2002).



FIGURA 6. Inoculação pelo método do corte do caule e sem ferimento logo abaixo do meristema apical. Fonte: Sagata (2009).

A primeira avaliação do tamanho da lesão foi aos cinco DAI dos três métodos de inoculação, e como não foram observadas diferenças estatísticas na primeira avaliação do método corte do caule, realizou-se a segunda avaliação oito DAI. Neste período,

houve precipitações médias de 21 mm dia<sup>-1</sup> e temperatura média máxima de 26,5°C e mínima de 20,6°C, respectivamente.

#### **3.4.3.1 Avaliação de tecido não colonizado, após a inoculação de *S. sclerotiorum* por três métodos: corte, com e sem ferimento; e dos métodos com e sem ferimento abaixo do primeiro trifólio totalmente expandido**

No dia 18/12, com auxílio de uma régua, mensurou-se a haste principal que ainda não havia sido colonizada pelo fungo, após 20 a 30 DAI (Figura 7).

Plantas mortas ou mesmo plantas sem ramificação ou brotações secundárias foram consideradas, na avaliação, como zero.

Plantas que foram inoculadas 30 DAI apresentaram ramificações secundárias, e plantas inoculadas 20 DAI foram maiores. Frequentemente, observou-se lesões marrom avermelhadas.



FIGURA 7. Plantas de soja sendo avaliadas. Fonte: Sagata (2009)

#### **3.4.4 Comparação entre os métodos corte do caule principal e inoculação das hastes de soja com ferimento entre o 4° e o 5° internódio (Médio)**

Dois métodos de inoculação foram testados: inoculação com ferimento na haste, entre o 5-6° internódio, e o método do corte de caule.

A avaliação do tamanho da lesão na haste foi realizada sete e quatorze DAI.

As plantas foram inoculadas no dia 13/12, no estágio entre R<sub>2</sub> (M-SOY 8527, BRSMG Garantia) e R<sub>3</sub> (MG/BR 46 Conquista, M-SOY 8352, BRS Favorita RR), R<sub>4</sub> (M-SOY 8000, Emgopa 316, BRSMG 68 Vencedora, M-SOY 8001, M-SOY 2002).

A precipitação média dos sete dias posteriores à inoculação foi de 10 mm dia<sup>-1</sup>, com temperaturas médias máximas de 28,1°C e mínima de 19,9°C e do dia 20/12 a 28/12 a precipitação média foi de 9,25 mm dia<sup>-1</sup>, T<sub>máx.</sub> média de 28,4°C e mínima de 20,5°C.

### **3.5 Coeficiente de Spearman**

No atual trabalho, o coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para mensurar se há correspondência entre métodos de inoculação e entre métodos e a média do ranking das cultivares, visando à seleção de genótipos resistentes à podridão branca da haste.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Inoculações no caule realizadas no laboratório – 2 Etapas: Casa-de-vegetação e laboratório

#### 4.1.1 Método de inoculação com e sem ferimento em hastes de soja com *S. sclerotiorum*

##### 4.1.1.1 1º Experimento: inoculação com ferimento em plantas, em V<sub>4</sub>-V<sub>5</sub>

A UFUS-Imperial foi a cultivar que obteve maior redução no progresso da lesão (47,62%), em relação à cultivar BRSMG Garantia que teve maior tamanho de lesão (Tabela 1).

Neste primeiro teste, aos três DAI, a média das lesões mensuradas foi de 4,97 cm.

As cultivares mais suscetíveis foram M-SOY 6101, BRSMG 68 Vencedora e BRSMG Garantia.

TABELA 1. Tamanho da lesão de *Sclerotinia sclerotiorum* em hastes de soja do primeiro experimento incubado em laboratório. UFU, Uberlândia, 2009.

Cultivares	Tamanho da lesão (cm)	% de redução no tamanho da lesão
UFUS-Imperial	3.34 a	47,62
UFUS-Milionária	4.42 b	30,68
MG/BR46 Conquista	4.54 b	28,80
M-SOY 8352	4.67 b	26,67
M-SOY 8527	4.72 b	25,97
M-SOY 2002	4.90 b	23,15
M-SOY 8008RR	5.01 b	21,42
M-SOY 8360	5.00 b	21,55
Emgopa 315	5.17 b	18,95
M-SOY 6101	5.50 c	13,74
BRSMG 68 Vencedora	6.05 c	5,11
BRSMG Garantia	6.38 c	0
<b>Média</b>	<b>4.97</b>	

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

#### 4.1.1.2 Método de inoculação com e sem ferimento em hastes de soja e avaliação do número de escleródios

As cultivares que apresentaram menor lesão e que diferiram estatisticamente das demais foram a M-SOY 8527, MG/BR46 Conquista, M-SOY 8008 e M-SOY 2002. Estas obtiveram redução do tamanho da lesão, em relação à cultivar mais suscetível (UFUS-Mineira), de 35,53% (M-SOY 2002) a 49,19% (M-SOY 8527) (Tabela 02).

TABELA 2. Tamanho da lesão, número de escleródios e % de redução no progresso ou tamanho da lesão, inoculando-se plantas através de ferimento e sem ferimento do 2º experimento em laboratório. UFU, Uberlândia, 2009.

Cultivares	Tamanho da lesão (cm)		Nº de escleródios	Médias	% de redução no tamanho da lesão
M-SOY 8527	6.06 a	0.00 a	3,86 b	3.03 a	49,19
MG/BR46 Conquista	6.89 a	0.00 a	5,43 c	3.45 a	42,20
M-SOY 8008	7.11 a	0.07 a	3,14 b	3.59 a	39,76
M-SOY 2002	7.33 a	0.36 a	3,57 b	3.85 a	35,53
Emgopa 316	7.86 b	0.00 a	2,00 a	3.93 a	34,13
UFUS-Capim Branco	8.38 b	0.07 a	3,43 b	4.22 a	29,17
UFUS-Carajás	9.57 c	3,86 a	3,86 b	4.79 b	19,76
BRSMG68 Vencedora	10.07 c	0.00 a	4,00 b	5.04 b	15,57
UFUS-Guará	10.17 c	0.00 a	1,71 a	5.08 b	14,77
M-SOY 8352	10.32 c	0.14 a	3,29 b	5.23 b	12,31
M-SOY 8360	10.57 c	0.14 a	3,29 b	5.64 b	10,18
M-SOY 8000	10.64 c	0.07 a	3,29 b	5.36 b	6,79
UFUS-Tikuna	10.83 c	0.28 a	3,71 b	5.56 b	5,39
UFUS-Mineira	11.93 c	0,00 a	3,00 b	5.96 b	0,00
<b>Média</b>	<b>9.12 A*</b>	<b>0.12B**</b>	<b>3,40</b>	<b>4,62</b>	

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

\* Com ferimento; \*\* Sem Ferimento

Segundo Pratt (1991), alguns métodos de inoculação podem exigir ferimentos por picadas nos sítios de inoculação, para uma infecção eficiente. No presente trabalho, o local de inoculação influenciou nos resultados, pois o tecido do internódio (3º- 4º) inoculado era mais lignificado, segundo Peltier, 2009.

Peltier e colaboradores (2009) observaram que os nós do terceiro trifólio apresentaram 142,4 g kg<sup>-1</sup> de tecido de caule, maior que o nó do quarto trifólio totalmente expandido (130,0 g kg<sup>-1</sup>), e não diferiram dos internódios entre o 3º e o 4º trifólio (I<sup>3-4</sup>) e internódio entre o 2º e o 3º trifólio (I<sup>2-3</sup>), sendo que o nó do quarto trifólio

apresentou menor concentração de lignina, diferindo do nó do terceiro trifólio e do I<sup>2-3</sup> e I<sup>3-4</sup>.

Nos dois experimentos conduzidos em laboratório, a cultivar BRSMG68 Vencedora foi suscetível.

Quando se avaliou o número de escleródios por cultivar, observou-se o seguinte resultado: UFUS-Guará e Emgopa 316 produziram menos escleródios (1,71 e 2,00 por planta, respectivamente). No entanto, elas foram consideradas, por apresentarem lesões grandes; MG/BR46 Conquista produziu a maior quantidade de escleródios (5,43), apesar de ser considerado resistente, invertendo a idéia de que lesões maiores produzem maior quantidade de escleródios (Tabela 2).

Em trabalhos conduzidos por Vuong e colaboradores (2004), houve diferenças significativas na formação de escleródios dentro do caule de Williams 82 (padrão de suscetibilidade), com 4,5 por planta, e NKS 19-90 (padrão de resistência), com 1,2 escleródios por planta.

A média do tamanho da lesão, do método com ferimento, foi 54% maior que a média do primeiro teste. Isso se deve ao fato do maior número de plantas existentes no copo, por competição de luz entre as plantas, os que as tornam mais estioladas.

Cline e Jacobsen (1983); Boland e Hall (1987) e Chun colaboradores (1987) observaram que as condições de crescimento em casa-de-vegetação antes da inoculação, especialmente a intensidade da luz, podem ser um dos fatores mais importante, em que plantas estioladas são mais suscetíveis que as não estioladas.

## **4.2 Aplicação do método com ferimento na área experimental – 2 Etapas: Laboratório e Campo**

### **4.2.1 Inoculação em folha destacada - 1º Etapa: Laboratório**

Trabalhos com folha destacada (CHUN et al., 1987; KIM et al., 2000) têm mostrado correlações significativas com resultados de campo, no entanto, somente um dos cinco testes foram correlacionados.

Wegulo e colaboradores (1998) obtiveram correlação de 0,55 entre o método de folhas destacadas e experimentos de campo.

Price e Calhoun (1975) compararam a patogenicidade de 14 isolados de *S. sclerotiorum* em 11 hospedeiros diferentes e a soja não foi incluída. Eles demonstraram

que houve variação no grau de patogenicidade, inoculando-se diferentes espécies hospedeiras.

Pratt e Rowe (1995) estudaram diversos isolados de *S. sclerotiorum* e *S. trifoliorum*. Estes diferiram nos graus de virulência em cultivares de alfafa e foram observadas interações entre experimentos x cultivar e experimentos x isolados, mas não isolado x cultivar.

Quando inoculado com o isolado Girassol, todas as cultivares foram consideradas suscetíveis, com severidades maiores que 50% (Tabela 3).

TABELA 3. Reação de cultivares de soja à diferentes isolados de *S. sclerotiorum* pelo método da folha destacada. Uberlândia, 2009.

Cultivar	Isolados							Médias
	ABC	Campo Alegre	Girassol	Índia-nópolis	Jataí	Patos	Romaria	
M-SOY 8352	23,33 b	12,00a	49,33 b	12,00 a	51,67d	66,67d	41,67 d	36.67 a
M-SOY 2002	15,67 a	26,67c	55,00 c	43,33 d	55,00d	50,00c	15,00 a	37.24 a
MG/BR46 Conquista	15,67 a	25,00c	75,00 e	50,00 e	51,67d	65,00d	25,00 b	43.90b
UFUS-Guará	55,00 e	12,00a	70,00 d	26,67 b	48,33c	70,00d	40,00 d	46.00 c
Emgopa 316	25,00 b	10,00a	80,00 f	43,33 d	23,33a	68,33d	82,33 h	47.62 c
UFUS-Carajás	12,00 a	21,67b	80,00 f	97,00 h	65,00 f	25,00a	82,33 h	54.71d
M-SOY 8001	80,00 h	15,00a	58,67 c	40,00 d	92,33h	63,33d	30,00 c	53.62d
BRS Favorita RR	46,00 g	25,00c	41,67 a	28,33 b	71,67g	50,00c	86,67 h	52.14 e
UFUS-Capim Branco	60,00 f	48,33d	99,33 g	50,00 e	50,00 c	43,33b	55,00 e	58.00 f
BRSMG 68 Vencedora	45,00 d	12,00a	97,00 g	40,00 d	60,00 e	98,00e	60,00 f	58.38 f
Pionner	25,00 b	13,00a	98,00 g	55,00 f	65,67 f	97,33e	75,00 g	61.29g
M-SOY 8000	28,33 b	50,00d	95,00 g	55,00 f	58,33 e	97,67e	51,67 e	62.29g
M-SOY 8008	80,00 h	56,67e	97,67 g	73,33 g	36,67b	48,33c	91,67 i	69.19 i
M-SOY 8360	51,67 e	45,00d	97,00 g	56,67 f	98,00 i	98,00e	50,00 e	70.90 i
UFUS-Mineira	56,67 e	75,00 f	80,00 f	51,67 e	55,00d	94,33e	41,67 d	64.90h
UFUS-Impacta	97,00 i	61,33e	83,33 f	53,33 f	46,67c	95,33e	85,00 h	74.57 j
UFUS-Tikuna	36,67 c	20,00	94,33 g	97,67 h	93,33h	98,00e	95,00 i	76.43 l
M-SOY 8527	83,33 h	60,00e	55,00 c	97,67 h	98,67 i	99,33e	97,33 i	84.48k
<b>Médias</b>	<b>47,11E</b>	<b>32,70F</b>	<b>78,13A</b>	<b>53,76D</b>	<b>62,30C</b>	<b>73,78</b>	<b>61,46 C</b>	<b>58,46</b>

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

Ao inocular as folhas com o isolado de Campo Alegre, a cultivar Emgopa 316 comportou-se resistente à ele, e quando folhas de soja foram inoculadas pelo isolado de Indianópolis, somente a cultivar M-SOY 8352 se comportou como moderadamente resistente (Tabela 3).

Folhas da cultivar Emgopa 316 inoculadas com o isolado de Jataí apresentaram 23,33% de severidade (MR), enquanto as demais foram MS e S (Tabela 3), diferentemente do encontrado por Garcia (2008), em que a cultivar Emgopa 316, utilizando o isolado Jataí, obteve 0,67% de severidade, e as cultivares M-SOY 8360, M-SOY 8352, M-SOY 8008 foram classificadas como genótipos resistentes. No entanto, no trabalho atual a Emgopa 316 foi considerada moderadamente resistente, M-SOY 8360 e M-SOY 8352 suscetíveis e M-SOY 8008 moderadamente suscetíveis.

Em todos os trabalhos desenvolvidos por outros autores (CHUN et al., 1987; KIM et al., 2000; KULL et al., 2003), estima-se que a área lesionada em vez de utilizar a severidade por meio de escalas diagramáticas, dando maior precisão à severidade das lesões provocadas pelo fungo.

Wegulo e colaboradores (1998) observaram pontos importantes na repetibilidade do método de inoculação em folhas, uniformidade do tamanho da folha, local e umidade adequada durante a inoculação.

O isolado mais agressivo foi aquele proveniente das sementes de Girassol, com 78,13 % de severidade. Entretanto, todos os isolados apresentaram severidades maiores que 50%, exceto Campo Alegre (32,70%) e ABC (47,11%).

Na média geral, somente as cultivares M-SOY 2002, M-SOY 8352, MG/BR 46 Conquista, UFUS-Guará e Emgopa 316 comportaram-se como genótipos moderadamente suscetíveis, enquanto que as demais foram suscetíveis.

#### **4.2.2 Aplicação da metodologia com fermento no terço médio da planta - 2º Etapa: Campo**

Emgopa 316, Pioneer, BRSMG 68 Vencedora, M-SOY 8001, BRS Favorita RR, MG/BR 46 Conquista, UFUS-Mineira, UFUS-Guará e M-SOY 2002 obtiveram menores lesões e diferiram estatisticamente das demais cultivares (Tabela 4).



A cultivar BRSMG 68 Vencedora, nos testes anteriores realizados com plantas incubadas em câmara de crescimento, for suscetível, ao contrário do resultado aqui obtido.

TABELA 4. Tamanho de lesão causada por *Sclerotinia sclerotiorum* inoculadas em hastes de soja no terço médio, com auxílio de fermento realizado na área experimental. UFU, Uberlândia, 2009.

Cultivares	Tamanho da lesão (cm)	% de redução no tamanho da lesão
Emgopa 316	5.70 a	28,42
Pioneer	5.74 a	27,97
BRSMG 68 Vencedora	6.10 a	23,43
M- SOY 8001	6.37 a	19,99
BRS Favorita RR	6.59 a	17,18
MG/BR 46 Conquista	6.61 a	16,95
UFUS-Mineira	6.67 a	16,21
UFUS-Guará	6.71 a	15,79
M-SOY 2002	6.87 a	13,74
M-SOY 8360	7.06 b	13,39
UFUS-Impacta	7.16 b	10,09
M- SOY 8008	7.17 b	9,92
M-SOY 8008	7.31 b	8,24
M-SOY 8352	7.40 b	7,08
UFUS-Carajás	7.51 b	5,64
M-SOY 8527	7.80 b	1,99
UFUS-Tikuna	7.89 b	0,92
UFUS-Capim Branco	7.96 b	0,00
<b>Média</b>	<b>6,92</b>	

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

Em relação à cultivar UFUS-Capim Branco, de maior lesão (7,96 cm), as cultivares que apresentaram maior resistência tiveram percentuais de redução do tamanho da lesão, os quais variaram de 13,74 a 28,42%, respectivamente (Tabela 4).

A cultivar BRSMG 68 Vencedora contradiz os resultados anteriores, pois nos testes realizados em condições de laboratório, foi considerada como um genótipo suscetível.

A cultivar MG/BR 46 Conquista posicionou-se em terceiro lugar, em relação as 12 cultivares testadas do primeiro experimento, quando elas estavam entre V<sub>4</sub>-V<sub>5</sub>, e 2º lugar no teste do experimento, em que as plantas estavam entre V<sub>5</sub>-V<sub>6</sub>, pelo mesmo método de inoculação.

O mesmo ocorreu para a M-SOY 2002 e Emgopa 316 que mantiveram sua reação como genótipos resistentes.

Dentre os materiais desenvolvidos pela UFU, a UFUS-Impacta, UFUS-Carajás e UFUS-Tikuna foram suscetíveis, quando inoculados pelo método de folha destacada e nos testes onde as plantas foram incubadas e inoculadas em câmara de crescimento.

A correlação de ranking entre o método de inoculação de folhas destacadas e o método de inoculação com fermento em condições de campo foi de 0,36, pelo coeficiente de Spearman.

A condição de campo que se encontrava no momento da inoculação favoreceu o desenvolvimento da doença, plantas estioladas e acamadas pelo espaçamento e população de plantas utilizadas, além das irrigações ocorridas durante o período de inoculação.

A temperatura e a sensibilidade à luz, além de outros fatores, podem contribuir para a imprevisibilidade do desenvolvimento e progresso da doença em diferentes patossistemas (PENNYPACKER; RISIUS, 1999).

Dos quatro isolados estudados, aqueles provenientes de Romaria e sementes de Girassol foram os que tiveram lesões maiores e diferiram estatisticamente de Jataí e Campo Alegre (Tabela 5).

TABELA 5. Tamanho médio de lesão provocado por quatro isolados em hastes de soja inoculadas pelo método com fermento no terço médio das plantas. UFU, Uberlândia, 2009.

<b>Isolados</b>	<b>Médias</b>
Jataí	6.55 b
Campo Alegre	6.79 b
Girassol	7.11 a
Romaria	7.23 a
Média	6,92

\*Significativo, a 5% de significância, pelo teste de F. <sup>ns</sup> Não significativo.

Não houve interação significativa entre cultivar e isolados, diferentemente quando utilizado o método da folha destacada. Trabalho conduzido por Kull e colaboradores (2004) com 24 isolados, cuja inoculação foi descrita por Kull e colaboradores (2003), não observou interações entre isolado e cultivar, mas os valores da área abaixo da curva de progresso da doença (*AACPD*) variaram por isolado.

Recentes estudos apontam que o sucesso na identificação de cultivares resistentes e suscetíveis e detecção das interações é influenciado pelo isolado, pela técnica de inoculação e pelo tipo de análise estatística empregada (KULL et al., 2003).

### 4.3 Determinação de metodologia de inoculação para a seleção de genótipos de soja resistentes à *Sclerotinia sclerotiorum* em condições de campo

#### 4.3.1 Método de inoculação com e sem ferimento no primeiro internódio

Neste experimento, foram observadas lesões marrom-avermelhadas nas inoculações realizadas com ferimento, plantas com raízes, folhas encarquilhadas e folhas carijó. Plantas inoculadas sem ferimento, no primeiro internódio, apresentaram reações enegrecidas, cujas lesões foram superficiais, caracterizando reação de hipersensibilidade (Figura 8).

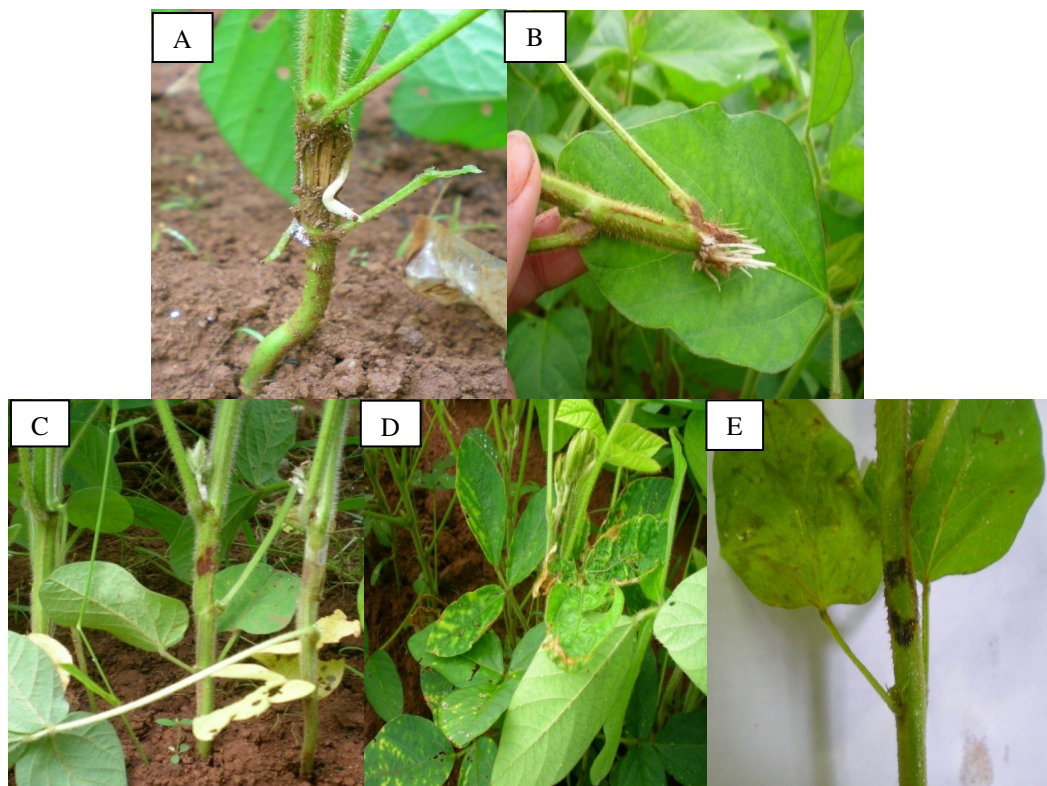


FIGURA 8. Reações apresentadas pelas plantas inoculadas com *S. sclerotiorum*. (A) e (B) Plantas com raízes adventícias (C) Lesão marrom-avermelhada e (D) Folhas encarquilhadas e sintomas do tipo carijó (E) Lesões enegrecidas. Fonte: Sagata (2009).

Foram contabilizadas plantas mortas, sendo que todas as mortes foram resultantes de inoculação com *Sclerotinia sclerotiorum* com auxílio de ferimento. Aos 45 dias após a realização deste experimento, não se detectou mais mortes decorrentes da inoculação.

Na observação de três blocos, no total, Emgopa 316 apresentou 11 plantas com raízes, MG/BR 46 Conquista (8), BRS Favorita RR (7), M-SOY 2002 (5), M-SOY 8352

(5), M-SOY 8527 (4), BRSMG Garantia (4), M-SOY 8001 (3), M-SOY 8000 (1) e BRSMG 68 Vencedora uma planta.

GUIMARÃES e STOTZ (2004) sugeriram que o ácido abscísico (ABA) contribui para a resistência contra *S. sclerotiorum*, aparentemente pela interação antagonista com o oxalato, em trabalhos realizados com *Arabidopsis thaliana*.

Alguns estudos mostram aumento no crescimento da raiz em presença do ABA, especialmente em baixas concentrações (YAMAGUCHI; STREET, 1977).

Fenótipos suscetíveis caracterizam-se por lesões encharcadas no caule e se tornam esbranquiçadas com o tempo, onde a medula é frequentemente destruída e substituída por escleródios. Em fenótipos resistentes, as lesões são pequenas, superficiais e de cor avermelhada e são restritos a região do nó (CLINE; JACOBSEN, 1983; CALLA, 2009).

Tanto na avaliação do tamanho da lesão, como de incidência, os materiais mais resistentes foram M-SOY 2002, M-SOY 8000, BRSMG 68 Vencedora, Emgopa 316 e M-SOY 8527, as quais diferiram estatisticamente das demais cultivares (Tabela 6).

TABELA 6. Tamanho da lesão de *Sclerotinia sclerotiorum* em hastes de soja inoculadas com e sem ferimento no primeiro internódio, e incidência de plantas mortas em condições de campo. UFU, Uberlândia, 2009.

Cultivares	Com ferimento	Sem ferimento	Média*	Incidência*
M-SOY 2002	1,11 a	0,03	0,57 a	0,00 a
M-SOY 8000	1,54 a	0,11	0,82 a	2,50 a
BRSMG 68 Vencedora	1,46 a	0,21	0,83 a	10,00 a
Emgopa 316	1,65 a	0,40	1,03 a	13,75 a
M-SOY 8527	2,86 a	0,33	1,59 a	22,50 a
MG/BR 46 Conquista	4,19 b	0,20	2,20 b	47,50 b
BRS Favorita RR	4,73 b	0,00	2,37 b	50,00 b
M-SOY 8352	4,64 b	0,24	2,44 b	37,50 b
M-SOY 8001	4,88 b	0,28	2,58 b	45,00 b
BRSMG Garantia	4,87 b	0,78	2,83 b	42,50 b
<b>Média</b>	<b>3,19 A</b>	<b>0,26 B</b>	<b>1,73</b>	

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

\*Médias transformadas em raiz quadrada mais 0,5.

O método de inoculação sem ferimento inoculando-se as plantas no primeiro internódio mostrou-se inadequado ao avaliar os genótipos quanto à resistência. Possivelmente, tecidos mais lignificados são inadequados para este procedimento.

As plantas que foram inoculadas com auxílio de ferimentos no caule apresentaram 100% das plantas infectadas, com média de 3,19 cm de lesão, enquanto que plantas sem ferimento apresentaram média de 0,26 cm. Sendo assim, o fungo não conseguiu infectar e colonizar o tecido no local inoculado de muitas plantas, quando se utilizou o método sem ferimento (Tabela 6).

Segundo Redfearn (1999), a parte inferior do caule possui maior teor de lignina na haste. A lignina impede o progresso da doença, proporcionando uma barreira à penetração mecânica, uma blindagem polissacarídica contra enzimas fúngicas, ou alterando componentes da parede para formar um substrato incompatível para as enzimas fúngicas (RIDE, 1983).

Observações entre a interação *Sclerotinia* x soja sugerem que o teor de lignina pré-formada no caule está associado à resistência à doença. Semelhante a resistência a *S. sclerotiorum* (ARAHANA et al., 2001; HOFFMAN et al., 2002; KIM e DIERS, 2000), as enzimas biossintéticas da lignina são poligenicamente herdadas.

#### **4.3.2 Método de inoculação com e sem ferimento abaixo do último trifólio totalmente expandido**

Não houve interação entre o método de inoculação utilizado x cultivar, no nível de 5% de significância, pelo teste de Scott-Knott (Tabela 7), ou seja, utilizando-se o mesmo método, as cultivares M-SOY 8001 e BRSMG 68 Vencedora apresentaram-se suscetíveis e as demais, resistentes.

A média da lesão do método sem ferimento foi menor, talvez seja devido a dois fatores associados: a temperatura (T<sub>máx</sub> média= 31°C e T<sub>min</sub>. Média= 21,96) durante o período de colonização, pós-inoculação e inoculação no internódio abaixo do último trifólio totalmente expandido, sendo aconselhado inocular no meristema ou logo abaixo do meristema apical.

*S. sclerotiorum* produz numerosas enzimas de plantas que degradam componentes da parede celular (HEGEDUS; RIMMER, 2005; LUMSDEN, 1979.), contudo, enzimas de degradação de lignina não foram relatados para *S. sclerotiorum* (PELTIER et al., 2009).

TABELA 7. Tamanho da lesão em hastes de soja, quando utilizado o método de inoculação com e sem ferimento abaixo do último trifólio totalmente expandido. UFU, Uberlândia, 2009.

<b>Cultivares</b>	<b>Com ferimento</b>	<b>Sem ferimento</b>	<b>Médias</b>
M-SOY 2002	3.06	1.27	2.52 a
Emgopa 316	3.77	2.19	2.62 a
M-SOY 8000	3.35	1.90	2.62 a
M-SOY 8527	3.84	1.56	2.70 a
M-SOY 8352	3.58	1.97	2.78 a
BRS Favorita RR	3.83	1.91	2.87 a
MG/BR 46 Conquista	4.14	2.37	3.26 a
BRSMG Garantia	4.40	2.32	3.36 a
M-SOY 8001	4.45	2.96	3.71 b
BRSMG 68 Vencedora	5.85	3.73	4.79 c
<b>Médias</b>	<b>4,02 A</b>	<b>2,22 B</b>	<b>3,12</b>

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

A influência das condições ambientais desfavoráveis à infecção é evidenciada ainda mais quando comparada a média da lesão do método com ferimento em condições favoráveis de temperatura e umidade.

Vuong e colaboradores (2004) demonstraram que o crescimento do fungo, em BDA e a 15°C, foi lento; muito rápido entre 20 a 25°C; e suprimida, a 30°C, e que os resultados em plantas foram similares nas lesões desenvolvidas a 25°C, onde as lesões de 14 DAI tiveram 15 cm de comprimento, e a 30°C as lesões não progrediam além dos 2cm.

A média da lesão do método com ferimento foi 90,5% maior que a média do método de inoculação no caule sem ferimento. Portanto, o ferimento facilita a entrada e a colonização também será mais rápida na planta.

Sem ferimento, o patógeno precisaria vencer a barreira da cutícula, formando apressórios, e isso atrasaria o início do processo de colonização da planta.

No entanto, as condições ambientais adversas podem desfavorecer o inóculo, e não haveria tempo suficiente para que haja a infecção efetiva da maioria das plantas.

Guimarães e Stotz (2004) confirmaram que a penetração inicial em folhas de *Vicia faba* ocorre via infecção por apressórios (LUMSDEN; 1973, JAMAUX et al. 1995), onde já é proposto, ainda que, a *Sclerotinia* penetra através da cutícula usando enzimas ou pela força mecânica, ou através de estômatos (PRIOR; OWEN, 1963).

#### 4.3.1 Avaliação de tecido não colonizado, após a inoculação de *S. sclerotiorum* por três métodos: corte, com e sem fermento; e dos métodos com e sem fermento abaixo do primeiro trifólio totalmente expandido

As cultivares que apresentaram os maiores comprimentos de tecido não colonizado pelo fungo foram: MG/BR 46 Conquista, BRSMG Garantia, Emgopa 316, M-SOY 8001, M-SOY 8352 e M-SOY 2002 (Tabela 8).

TABELA 8. Avaliação de tecido não colonizado, após a inoculação de *S. sclerotiorum* por três métodos: corte, com e sem fermento; e dos métodos com e sem fermento abaixo do primeiro trifólio totalmente expandido. UFU, Uberlândia, 2009.

Cultivares	Tamanho do tecido vegetal não colonizado (cm)
MG/BR 46 Conquista	18.79 a
BRSMG Garantia	17.44 a
Emgopa 316	17.29 a
M-SOY 8001	16.78 a
M-SOY 8352	16.16 a
M-SOY 2002	14.93 a
BRSMG 68 Vencedora	14.02 b
M-SOY 8527	13.14 b
BRS Favorita RR	11.80 b
M-SOY 8000	10.59 b
<b>Média</b>	<b>15,06</b>

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância

Segundo Zito e colaboradores (2006), as cultivares BRSMG Garantia, Monarca, Conquista e MGBR99-4656 apresentaram valores de incidência significativamente menores em campo naturalmente infestado na região de Sacramento, coincidindo com o trabalho realizado com a cultivar Conquista.

Foram observadas lesões marrom-avermelhadas em quase todas as cultivares, sendo que a maior parte das plantas inoculadas apresentou este tipo de coloração (Figura 9A).

Estudos recentes realizados por Calla e colaboradores (2009) identificaram possíveis genes envolvidos na defesa contra este patógeno, e possíveis alterações fisiológicas que ocorrem durante a infecção. O estudo sugere que plantas resistentes possivelmente reagem mais rápido, através da formação da agregação citoplasmática, do que em plantas suscetíveis. Duas peroxidases foram significativamente maiores em tecidos de plantas resistentes, além de oxidantes que são utilizados pelas células como

agentes modificadores da lignina, através da ligação cruzada dos componentes da parede celular. Alguns genes foram associados com o metabolismo secundário, significativamente maior em cultivares resistentes, denominados como sintase antocianidina, dando suporte a idéia de que a antocianina pode desempenhar um importante papel em defesa da soja contra *S. sclerotiorum* em cultivares resistentes (CALLA et al., 2009).

Haviam brotações laterais a partir do caule principal, do tecido que não foi colonizado e destruído pelo fungo, apesar de mais de 20-25 DAI (Figura 9B).

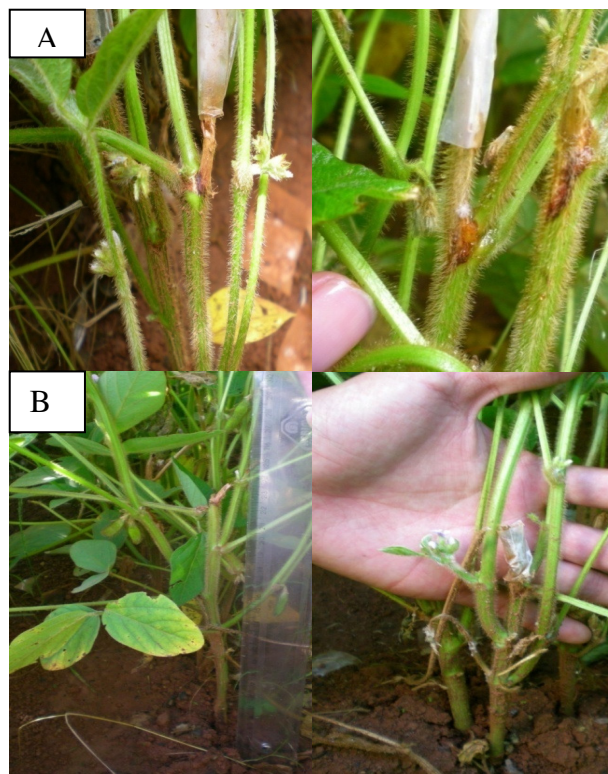


FIGURA 09. (A) Lesões marrom-avermelhadas. (B) Plantas com ramificações secundárias Fonte: Sagata (2009)

#### 4.4. Inoculação de *S. sclerotiorum* por três métodos: corte, sem e com fermento

O método de inoculação utilizando fermento resultou em fermentos maiores, em comparação ao método de inoculação sem fermento, seguida pelo método do corte do caule (Tabela 9), não havendo interação significativa entre os métodos e as cultivares, ou seja, os métodos são considerados iguais para o mesmo resultado da reação de resistência das cultivares.



No método com ferimento, obteve-se 54,4% de lesão maior que aquele obtido pelo método sem ferimento, e 63,66% maior em relação ao método de corte (Tabela 9).

TABELA 9. Tamanho da lesão em hastes de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* por três métodos: corte, sem ferimento e com ferimento. UFU, Uberlândia, 2009.

Cultivares	Corte	Sem Ferimento	Com Ferimento	Média
M-SOY 8527	5.53	6.55	6.11 a	6.06 a
M-SOY 8001	5.46	6.14	6.89 a	6.16 a
M-SOY 8352	5.54	6.22	6.77 a	6.18 a
Emgopa 316	4.93	6.68	7.10 a	6.24 a
BRS Favorita RR	6.30	5.82	7.15 a	6.42 a
M-SOY 8000	5.44	6.25	7.70 b	6.46 a
MG/BR 46 Conquista	5.95	6.91	7.09 a	6.65 a
BRSMG Garantia	6.23	7.04	7.88 b	7.05 b
BRSMG 68 Vencedora	5.75	7.36	8.14 b	7.08 b
M-SOY 2002	6.00	7.85	7.93 b	7.26 b
<b>Médias</b>	<b>5.71 C</b>	<b>6.68 B</b>	<b>7.27 A</b>	<b>6,55</b>

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

Devido às condições ambientais mais favoráveis deste experimento, em relação ao experimento anterior, a diferença entre as lesões dos métodos com e sem ferimento foi diminuída de 90,5% para o valor acima citado.

No método sem ferimento,, obteve 58,49% a mais de lesão em relação ao método de corte (Tabela 9).

O tamanho médio das lesões no método de corte do caule, foi menor, em relação aos demais métodos estudados, devido à retirada da parte apical da planta, pois se retira boa parte de tecido jovem ou menos lignificados.

O conteúdo de lignina pode ser de importância particular para a resistência à SSR, como na taxa de crescimento do fungo, e fatores de patogenicidade e virulência no avanço das hifas (MAXWELL; LUMSDEN, 1970).

Aos 8 DAI, a segunda avaliação do método corte da haste diferiu estatisticamente para as cultivares Emgopa 316 (Semiprecoce), M-SOY 8352 (Semiprecoce), M-SOY 8001(Semiprecoce), M-SOY 8000 (Semiprecoce) e M-SOY 8527 (Tardio) como resistentes, o que não aconteceu quando a avaliação foi realizada aos 5 DAI (Tabela 10).

TABELA 10. Tamanho da lesão em hastes de soja 8 DAI com *Sclerotinia sclerotiorum* por três métodos: corte, sem fermento e com fermento UFU, Uberlândia, 2009.

Cultivares	1ª avaliação Corte	2ª Avaliação Corte	Diferença
M-SOY 8527	5.53	8.58 a	3,05
M-SOY 8001	5.46	8.17 a	2,71
M-SOY 8352	5.54	7.94 a	2,40
Emgopa 316	4.93	7.46 a	2,53
BRS Favorita RR	6.30	9.44 b	3,14
M-SOY 8000	5.44	8.32 a	2,88
MG/BR 46 Conquista	5.95	10.29 b	4,34
BRSMG Garantia	6.23	10.37 b	4,14
BRSMG 68 Vencedora	5.75	9.99 b	4,24
M-SOY 2002	6.00	9.18 b	3,18
<b>Médias</b>	<b>5.71</b>	<b>8,97</b>	<b>3,26</b>

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

O aumento da lesão em relação à primeira avaliação foi de 2,53 cm, 2,40, 2,71, 2,88 e 3,05 respectivamente, enquanto que o restante dos materiais considerados suscetíveis neste experimento foi acima de 3,14cm (Tabela 10).

#### 4.5 Métodos de inoculação realizando o corte e fermento no caule principal entre o 4º e o 5º internódio (terço médio) na 1ª avaliação.

Não houve interação entre os métodos utilizados e as cultivares, e somente a cultivar BRSMG 68 Vencedora foi a mais suscetível (Tabela 11).

TABELA 11. Tamanho da lesão inoculada com *Sclerotinia sclerotiorum* através de duas metodologias: com fermento no terço médio e corte. UFU, Uberlândia, 2009.

Tratamentos	Ferimento	Corte	Médias
M-SOY 2002	10.12 a	8.63	9.38 a
M-SOY 8527	11.48 a	8.18	9.83 a
M-SOY 8352	10.89 a	8.95	9.92 a
Emgopa 316	12.40 a	7.93	10.16 a
MG/BR 46 Conquista	12.22 a	8.24	10.23 a
BRS Favorita RR	13.08 b	7.53	10.30 a
M-SOY 8001	12.44 a	8.84	10.64 a
M-SOY 8000	13.90 b	8.27	11.09 a
BRSMG Garantia	13.34 b	8.92	11.13 a
BRSMG 68 Vencedora	15.38 b	10.67	13.02 b
<b>Médias</b>	<b>12,53 A</b>	<b>8,61 B</b>	<b>10,57</b>

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

No método de inoculação com ferimento no terço médio, observou-se que as lesões abaixo do local inoculado são bem menores, em relação à lesão acima do local inoculado (Figura 10).



FIGURA 10. Lesão causada pela inoculação de *S. sclerotiorum*, abaixo e acima do local inoculado.

#### 4.6 Métodos de inoculação realizando o corte e ferimento no caule principal entre o 4º e o 5º internódio (terço médio) na 2ª avaliação.

Ao testar três métodos de inoculação do experimento, o método de corte, aos cinco DAI, não apresentou interação da cultivar, pelo teste de Scott-Knott, à 5% de significância. Contudo, após três dias da primeira avaliação, o método conseguiu distinguir os genótipos quanto à resistência à *S. sclerotiorum*, diferentemente do que ocorre neste experimento (Tabela 12).

TABELA 12. Tamanho da lesão em hastes de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* por meio de duas metodologias: com ferimento no terço médio e corte na segunda avaliação. UFU, Uberlândia, 2009.

Tratamentos	Com Ferimento	Corte	Médias
M-SOY 2002	16.86 a	11.35	14.10 a
Emgopa 316	18.45 a	10.53	14.49 a
MG/BR 46 Conquista	19.20 a	9.99	14.59 a
M-SOY 8352	17.64 a	11.67	14.65 a
BRS Favorita RR	20.08 a	10.52	15.30 a
M-SOY 8527	18.69 a	12.10	15.40 a
M-SOY 8001	20.72 a	10.74	15.73 a
M-SOY 8000	21.91 a	11.19	16.55 a
BRSMG Garantia	23.17 b	12.02	17.49 b
BRSMG 68 Vencedora	26.40 c	14.81	20.61 c
Médias	20,15 A	11,56 B	15,83

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

Kull e colaboradores (2004) mensuraram lesões depois de 14 dias após a inoculação e produziram lesões de 7,9 a 10,3cm, pelo método de corte de caule.

Em trabalhos conduzidos por Vuong e colaboradores (2004), 14 dias após a inoculação, as lesões de NKS19-90 foram de 10,2 cm e de Williams 82 foram 14,80 cm.

Neste estudo, 14 DAI, as lesões do método corte variaram entre 9,99 (MG/BR 46 Conquista) a 14,81 (BRSMG 68 Vencedora) cm (Tabela 12). Valores muito próximos aos que foram encontrados por Vuong e colaboradores (2004) em materiais considerados padrões de resistência e suscetibilidade, sendo que o método utilizado foi o mesmo.

## **5. Correlação de Spearman**

Wegulo e colaboradores (1998) utilizaram o coeficiente de Spearman correlacionando o ranking das cultivares inoculadas em condições controladas com as mesmas cultivares em experimentos de campo, e também entre cultivares em diversas repetições para cada método de inoculação. Chen e Wang (2005) utilizaram este coeficiente para correlacionar diferentes métodos de inoculação. Já Kull e colaboradores (2003) correlacionaram métodos de inoculação, tanto em soja como em feijão, com a interação cultivar x isolado. Peltier e colaboradores (2009) correlacionaram concentração de lignina e a severidade da doença no campo.

### **5.1 Ranking das cultivares**

De acordo com o ranking de cultivares (Tabela 13), observamos os seguintes comportamentos:

- ✓ A cultivar BRSMG 68 Vencedora, quando inoculada no ápice da planta, consistentemente, apresentam-se como a mais suscetível. No entanto, em tecidos mais lignificados na base do caule, ela se comportou como resistente.
- ✓ BRSMG Garantia foi suscetível, independente da localização do inóculo na planta.
- ✓ BRS Favorita RR e MG/BR 46 Conquista ficaram em posição intermediária, alternando algumas vezes nas primeiras posições.

- ✓ Emgopa 316 foi a cultivar que, na média geral do ranking, ficou em primeiro lugar. Na maior parte dos experimentos ela ocupou as primeiras posições, o que indica que poderá ser a cultivar detentora de padrão de resistência.

Segundo Wegulo e colaboradores (1998), as razões para as variações no ranking das cultivares entre diferentes métodos de avaliação no campo e ambientes controlados, em parte, são devidos às diferenças no repertório de defesa entre as cultivares. Algumas cultivares podem variar sua estratégia de defesa, dependendo das condições ambientais ou o método de avaliação da resistência empregada.

## **5.2 Correlação entre os métodos de inoculação através do ranking das cultivares**

Através do ranking das cultivares, em todos os métodos avaliados no campo no mês de novembro e dezembro de 2009, calculou-se os coeficientes de correlação de Spearman, descritos na tabela 14.

A interpretação das correlações foi realizada comparando-se os métodos de inoculação e a média geral do ranking das cultivares.

### **5.2.1 Método de inoculação com e sem ferimento no primeiro internódio em condições de campo**

Estatisticamente, não houve interação entre cultivar e método. No entanto, a correlação de ranking nos mostra que as diferenças encontradas entre as cultivares é devido a  $r_s = 0,96$  ao método de inoculação com ferimento no primeiro internódio (Tabela 14).

A correlação entre a avaliação de incidência e método de inoculação com ferimento foi de  $r_s = 0,81$  (Tabela 14).

### **5.2.2 Método de inoculação com e sem ferimento abaixo do último trifólio totalmente expandido em experimento conduzido em condições de campo**

Neste caso, o método de inoculação, com e sem ferimento abaixo do primeiro trifólio totalmente expandido, obteve uma interação não significativa com valor de  $Pr > F_c 0.94020$  (Tabela 7), considerado alto. Na correlação de ranking, constatamos que

os dois métodos com ( $r_s=0,88$ ) e sem ferimento ( $r_s=0,84$ ) (Tabela14) poderão ser usados; com vantagem para o uso do método sem ferimento, pois economizaria tempo e trabalho, nas condições climáticas descritas anteriormente.

### **5.2.3 Inoculação de *S. sclerotiorum* por três métodos: corte, sem ferimento e com ferimento e segunda avaliação do corte**

Novamente a estatística mostrou que não houve interação entre cultivar e os métodos utilizados na inoculação da doença. No entanto, na correlação de Spearman, as diferenças entre as cultivares se deve à  $r_s=0,90$  pelo método de inoculação por meio de ferimento. O método de inoculação sem ferimento logo abaixo do meristema apical teve correlação de  $r_s =0,76$  (Tabela 14).

O coeficiente de correlação da primeira avaliação do método corte do caule com a da segunda avaliação foi de  $r_s =0,78$  (Tabela 14), demonstrando que houve mudanças de posição das cultivares entre as duas avaliações. A M-SOY 8527 estava em quarto lugar e caiu para o 5º, M-SOY 8001 manteve-se em 3º lugar, M-SOY 8352 saiu do 5º lugar e posicionou para o 2º lugar, a Emgopa 316 manteve-se em 1º lugar, MG/BR 46 Conquista, M-SOY 8000, BRSMG 68 Vencedora caíram duas posições e M-SOY 2002 subiu duas (Tabela 13).

Não compreende-se o porquê das correlações negativas, ou muito baixas, com outros métodos. Esta dúvida persiste pelo fato das condições ambientais serem mais favoráveis ao desenvolvimento do fungo na planta. Entretanto, o coeficiente de variação foi baixo.

### **5.2.4 Avaliação de tecido não colonizado, após a inoculação de *S. sclerotiorum* por três métodos: corte, com e sem ferimento; e dos métodos com e sem ferimento abaixo do primeiro trifólio totalmente expandido**

Este método de avaliação obteve coeficientes de correlações baixas e negativas. Comparando-o com outros métodos e com a média de ranking das cultivares, o coeficiente foi negativo:  $r_s = -0,17$  (Tabela 14).

### **5.2.5 Métodos de inoculação realizando o corte e ferimento no terço médio das plantas na primeira avaliação (7DAI)**

As diferenças entre as cultivares se devem à correlação de  $r_s = 0,95$  com o método de inoculação utilizando estilete, para provocar ferimentos no terço médio da planta (Tabela 14).

A primeira avaliação do método corte no caule teve correlação moderada de  $r_s = 0,64$  com a segunda avaliação. Novamente, houve mudanças de posição das cultivares, a M-SOY 8527 estava na terceira posição passando a ser a nona na segunda avaliação, BRSMG 68 Vencedora estava em quarto e passou para o 1º lugar, BRS Favorita RR caiu para o segundo lugar, M-SOY 2002, M-SOY 8000, BRSMG Garantia, BRSMG 68 Vencedora mantiveram suas posições (Tabela 13).

Wegulo e colaboradores (1998), utilizando o método de inoculação no caule com disco de micélio, em plantas de estágio  $R_1 - R_3$ , e avaliando diariamente em ambiente controlado, constatou diferenças significativas no tamanho da lesão em todas as cultivares e em todos os experimentos, no entanto, há uma flutuação dos rankings entre os dias de avaliação e alta interação cultivar x dias de avaliação.

No entanto, Vuong e colaboradores (2004), pelo método de “cut-stem”, vislumbrou lesões mensuradas após 14 DAI. As correlações em testes de casa-de-vegetação e a severidade da doença no campo variaram de  $r_s = 0,47$  a  $r_s = 0,80$ , e cita Kull e colaboradores (2003) que este método de inoculação foi estatisticamente melhor que folhas destacadas e inoculação de cotilédones, sendo que esta técnica conseguiu identificar PI 194634 e PI 194639 com elevada resistência à *S. sclerotiorum*.

No método de inoculação com ferimento no terço médio da planta não houve mudanças entre a primeira e a segunda inoculação. Este método é mais estável do que o método de corte, pois obteve  $r_s = 0,94$  (Tabela 14).

#### **5.2.5.1 Segunda avaliação (14DAI) dos métodos de inoculação realizando o corte e ferimento no terço médio da planta**

Apesar da análise estatística não acusar a interação dos métodos com a cultivar, as diferenças entre as cultivares é demonstrada pelo coeficiente de correlação de  $r_s$

=0,92, com o método de inoculação com fermento no terço médio, enquanto que o método corte obteve  $r_s=0,54$  (Tabela 14).

### 5.2.6 Coeficientes de correlação do ranking médio das cultivares x metodologia

Os maiores coeficientes de correlação do ranking geral obtidos pelas médias das posições das cultivares em todos os métodos e avaliações realizadas foram (Tabela 14):

- ✓ Coeficiente correlação de  $r_s=0,86$ , utilizando qualquer método de inoculação com ou sem fermento logo abaixo do trifólio, completamente expandido. Contudo, o método com fermento contribui melhor nas diferenças entre as cultivares, com correlação de  $r_s=0,79$  maior que  $r_s=0,68$  e pelo método sem fermento.
- ✓ O coeficiente de correlação entre o método corte do caule ou o fermento no terço médio da planta da primeira avaliação foi de  $r_s=0,85$ . Entretanto, o método de inoculação com fermento no terço médio contribui mais na seleção das cultivares com coeficiente de correlação  $r_s=0,71$ , maior que o método corte de  $r_s=0,59$ .
- ✓ Quando realizou-se a segunda avaliação do método acima, corte e fermento no terço médio, obteve-se coeficiente de correlação de  $r_s=0,82$ , sendo que o método de inoculação, no terço médio da planta com fermento, contribui mais da média com o  $r_s=0,86$ .

Outras pesquisas indicaram que a resistência parcial em soja contra *S. sclerotiorum* é influenciada por fatores do ambiente (HOFFMAN et al., 2004; PENNYPACKER; RISIUS, 1999).

Bons métodos de seleção, que consigam diferenciar pequenas variações nos níveis de resistência, são absolutamente 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).



TABELA 13. Ranking de 10 cultivares de soja dos experimentos conduzidos na área experimental, visando avaliar resistência à *Sclerotinia sclerotiorum*. UFU, Uberlândia, 2009.

Cultivares	Ranking																			Média Geral	
	1º internódio				Último trif.			3 métodos				2ºAv.		Ct e CF3º			2ºav.Ct e CF3º				T.N.C.
	Média	CF	SF	Inc.	Média	CF	SF	Média	CF	SF	Ct	Ct	Média	Ct	C/F/3º	Média	Ct	CF3º			
M-SOY 2002	1	1	2	1	1	4	1	10	9	10	8	6	1	6	1	1	6	1	6	3.94	
M-SOY 8000	2	3	3	2	3	2	3	6	7	4	2	4	8	5	9	8	5	8	10	5.00	
M-SOY 8001	9	10	7	7	9	9	9	2	3	2	3	3	7	7	6	7	4	7	4	6.17	
M-SOY 8352	8	7	6	6	5	3	5	3	2	3	5	2	3	9	2	4	7	2	5	4.72	
M-SOY 8527	5	5	8	4	4	6	2	1	1	5	4	5	2	3	3	6	9	4	8	4.44	
MG/BR 46 Conquista	6	6	4	10	7	7	8	7	4	7	7	9	5	4	4	3	1	5	1	5.33	
Emgopa 316	4	4	9	5	2	1	6	4	5	6	1	1	4	2	5	2	3	3	3	3.78	
BRS Favorita RR	7	8	1	9	6	5	4	5	6	1	10	7	6	1	7	5	2	6	9	5.44	
BRSMG Garantia	10	9	10	8	8	8	7	8	8	8	9	10	9	8	8	9	8	9	2	8.22	
BRSMG 68																					
Vencedora	3	2	5	3	10	10	10	9	10	9	6	8	10	10	10	10	10	10	7	7.94	

CF = Com ferimento

MRk. Média geral do ranking das avaliações dos métodos estudados pelo ranking por cultivar ;

SF= Sem ferimento

Cult. = Cultivar;

1º internódio= Método de inoculação com e sem ferimento inoculando-se o primeiro internódio;

Inc.=Incidência de plantas mortas;

Ct= Método de inoculação corte em hastes de soja;

Último trif.= Método de inoculação com e sem ferimento abaixo do último trifólio totalmente expandido;

2ºAv.= Segunda avaliação;

CF3º = Método de inoculação no caule com ferimento no terço médio da planta;

T.N.C. = Avaliação do tamanho de tecido não colonizado pelo fungo após a inoculação;

TABELA 14. Correlação do ranking das metodologias utilizadas para a seleção de genótipos resistentes à *Sclerotinia sclerotiorum*.  
UFU, Uberlândia, 2009.

		1º internódio				Último trifólio			3 métodos				2ºAv.	Ct e CF3º			2 avaliação			Av.	Cult.	
		Média	CF	SF	Inc.	Média	CF	SF	Média	CF	SF	Ct	Ct	Média	Ct	CF3º	Média	Ct	CF3º	T.N.C	MRk	
1º internódio	Média	1.00	0.96	0.47	0.79	0.58	0.38	0.43	-0.41	-0.43	-0.45	0.25	0.13	0.24	0.15	0.05	0.25	-0.09	0.21	-0.47	0.44	
	CF		1.00	0.35	0.81	0.52	0.32	0.36	-0.49	-0.48	-0.61	0.19	0.05	0.22	-0.02	0.08	0.21	-0.26	0.21	-0.36	0.33	
	SF			1.00	0.14	0.19	0.15	0.33	-0.37	-0.31	0.12	-0.37	-0.16	0.10	0.20	0.03	0.24	0.36	0.12	-0.53	0.24	
	Inc.				1.00	0.50	0.30	0.45	-0.22	-0.36	-0.39	0.38	0.32	0.19	-0.22	0.05	-0.02	-0.53	0.15	-0.53	0.28	
Último trifólio	Média					1.00	0.88	0.84	0.04	0.08	-0.08	0.27	0.48	0.72	0.49	0.55	0.68	0.18	0.73	-0.25	0.86	
	CF						1.00	0.65	0.18	0.16	0.20	0.38	0.62	0.52	0.47	0.36	0.59	0.32	0.61	-0.22	0.79	
	SF							1.00	0.08	0.10	0.05	-0.04	0.22	0.67	0.44	0.50	0.44	-0.03	0.59	-0.53	0.68	
3 métodos	Média								1.00	0.90	0.76	0.53	0.64	0.28	0.32	0.24	0.04	0.10	0.22	-0.10	0.35	
	CF									1.00	0.61	0.38	0.49	0.48	0.30	0.50	0.26	0.20	0.42	0.13	0.44	
	SF										1.00	0.21	0.47	-0.01	0.35	-0.05	-0.05	0.39	0.01	-0.32	0.20	
	Corte											1.00	0.78	0.07	0.07	-0.02	0.01	0.01	0.09	-0.07	0.39	
	2ºAv. Ct												1.00	0.41	0.15	0.32	0.35	0.13	0.49	-0.16	0.65	
Ct e CF3º	Média													1.00	0.38	0.95	0.84	0.14	0.96	0.02	0.85	
	Corte														1.00	0.18	0.48	0.64	0.32	-0.18	0.59	
	CF3º															1.00	0.82	0.13	0.94	0.24	0.71	
2ºav.Ct e CF3º	Média																1.00	0.54	0.92	0.26	0.82	
	Corte																	1.00	0.24	0.25	0.40	
	CF3º																		1.00	0.12	0.86	
T.N.C.	Av.																			1.00	-0.17	
MRk.	Cult.																					1,00

## 6. CONCLUSÕES

- ✓ O melhor método de inoculação foi a inoculação com ferimento no terço médio da planta onde se encontravam no estágio R<sub>2</sub>-R<sub>4</sub>, sugerido pela avaliação de 14 DAI.
- ✓ Padrão de resistência para trabalhos futuros foi a cultivar Emgopa 316 e de suscetibilidade BRSMG Garantia e BRSMG 68 Vencedora

## REFERÊNCIAS

- ABAWI, G. S.; GROGAN, R. G. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, p. 899-910, 1979.
- ABAWI, G. S.; GROGAN, R. G. Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 65, p. 300-309, 1975.
- ADAMS, P. B.; AYRES, W. A. Ecology of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v.69, n.8, p. 896-899, 1979.
- AGRIOS, G. **Plant Pathology**. 4. ed. San diego: Academic Press, 1997.
- ARAHANA, V. S., GRAEF, G. L., SPECHT, J. E., STEADMAN, J. R.; ESKRIDGE, K. M.. Identification of QTLs for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 41, p.180-188, 2001.
- AUNG, M.; ROWE, E.; PRATT, R. Necessity of replicated measurements for selection of alfalfa plants resistance or susceptible to stem inoculation by *Sclerotinia trifoliorum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 78, p. 14-17, 1994.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMON, M. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Madrid, v. 7, n. 4, p. 249-260, 2004.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Evaluating soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* under field conditions. **Plant Disease**, Saint Paul., v. 71, p. 934-936, 1987.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 16, p. 93 – 108, 1994.
- BOLAND, G.J.; HALL, R. Growthroom evaluation of soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal Plant Science**, Ottawa, v. 66, p. 559-564, 1986.
- CABI DATABASES. **Dictionary of the Fungi**. Disponível em: <http://www.speciesfungorum.org/names/fundic.asp>. Acesso em: 21 dez 2008.

CALLA, B.; VUONG, T.; RADWAN, O.; HARTMAN, G. L.; CLOUGH, S. J. GENE Expression Profiling Soybean Stem Tissue Early Response to *Sclerotinia sclerotiorum* and In Silico Mapping in Relation to Resistance Markers. **The Plant Genome**, Madison, v. 2, p.149-166, 2009.

CESSNA, S. G.; SEARS, V. E.; DICKMAN, M. B.; LOW, P. S. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, Suppresses the oxidative burst of the host plant. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 2191-2199, 2000.

CHEN, Y.; WANG, D. Two convenient methods to evaluate soybean for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.89, p.1268-1272, 2005.

CHUN, D.; KAO, L.B.; LOCKWOOD, J.L.; ISLEIB, T.G.. 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.

CLINE, M. N.; JACOBSEN, B. J. Methods for evaluating soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.67, p.784-786, 1983.

COBER, E. R. et al. Partial Resistance to White Mold in a Transgenic Soybean Line. **Crop Science**, Madison, v. 43, p. 92-95, 2003.

COLEY, P.D.; AIDE, T.M. Red coloration of tropical young leaves: a possible antifungal defence? **Journal of Tropical Ecology**, England, v. 5, p.293-300, 1989.

COLEY-SMITH, J. R.; COOKE, R. C. Survival and germination of fungal sclerotia. **Annual Review of Phytopathology**, v. 9, p. 65-92, 1971.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Brasil., **Acompanhamento de safra brasileira**: grãos, intenção de plantio, primeiro levantamento, out. 2009. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/2graos\\_09.10.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/2graos_09.10.pdf)>. Acesso em: 20 out. 2009.

COSTA, G.R.; COSTA, J.L.S. Influência do solo e de substratos para produção de escleródios na germinação carpopogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 2, p. 83-87, 2006.

COYNE, D.P. ; STEADMAN, J.R. ; ANDERSON, F.N. Effect of modified plant architecture of great northern dry bean varieties (*Phaseolus vulgaris*) on white mold severity, and components of yield. **Plant Disease**, Saint Paul, v.5, p. 379-382, 1974.

DANIELSON, G. A.; NELSON, B. D.; HELMS, T. C. Effect of *Sclerotinia* stem rot on yield of soybean inoculated at different growth stages. **Plant Disease**, Saint Paul, v.88, p. 297-300, 2004.

DILLARD, H. R.; LUDWIG, J. W., HUNTER, J. E. Conditioning sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* for carpogenic germination. **Plant Disease**, Saint Paul, v.79, p. 411-415, 1995.

DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. Compendium of soil fungi, 1, London, Academic Press, 1980.

ECHANDI, E.; WALKER, J.C. Pectolytic enzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 47, p. 303-306, 1957.

EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de Produção de Soja: região central do Brasil 2009 e 2010**. Londrina, 2009 Disponível em:  
<<http://www.cnpso.embrapa.br/download/Tecnol2009.pdf>> Acesso em 20 out. 2009.

FERRAR, P.H.; WALKER; J.R.L. O-diphenol oxidase inhibition-an additional role for oxalic acid in the phytopathogenic arsenal of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotinia rolfsii*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.43, p.415-422, 1993.

FERREIRA, F.A. **Sistema SISVAR para análises estatísticas**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2000. Disponível em:  
<http://www.dex.ufla.br/~danielff/software.htm>>. Acesso em: 06 dez. 2010.

FULLER, P. A.; COYNE, D. P.; STEADMAN, J. R. Inheritance of resistance to white mold disease in a diallel cross of dry beans. **Crop Science**, Madison, v. 24, p. 929-933, 1984.

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) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

GASPAROTTO, L. **Sobrevivência de *Sclerotinia sclerotiorum* em solos cultivados com gramíneas e controle químico da podridão de alface**. Viçosa, 1980. 42f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1980.

GODOY, G., J.R. STEADMAN, M.B. DICKMAN.; R. DAM. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 37, p. 179–191, 1990.

GRAU, C. R. Sclerotinia stem rot of soybean. In: Soybean Diseases of the North Central Region. T. D. WYLLIE; D. H. SCOTT, **The American Phytopathological Society**, Saint Paul, p. 56-66, 1988.

GRAU, C. R.; RADKE, V. L. Effects of cultivars and cultural practices on Sclerotinia stem rot of soybean. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 68, p.56-58, 1984.

GRAU, C.R.; RADKE, V.L. Resistance of soybean cultivars to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 66, p. 506-508, 1982.

GUIMARÃES, R. L.; STOTZ, H. U. Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 136, p. 3703-3711, 2004.

HEGEDUS, D. D.; RIMMER, S. R. *Sclerotinia sclerotiorum*: When “to be or notbe” a pathogen? **FEMS Microbiol. Let.**, England, v. 251, p.177-184, 2005.

HEINRICH, G. M., FRANCIS, C. A., EASTIN, J. D. Stability of grain sorghum yield components across diverse environments. **Crop Science**, Madison, v.23, p.209-212, 1983.

HINTZ, R. W.; ALBRECHT, K. A.; OPLINGER, E. S. Yield and quality of soybean forage as affected by cultivar and management practices. **Agronomy Journal**, Madison, v.84, p.795-798, 1992.

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

HOFFMAN, D. D., HARTMAN, G. L., MUELLER, D. S., LEITZ, R. A., NICKELL, C. D., PEDERSEN, W. L. Yield and seed quality of soybean cultivars infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**. Saint Paul, v.82, p.826-829, 1998.

HUNTER, J.E. ; ABAWI, G.S. ; CROSIER, D.C. Effects of timing, coverage, and spray oil on control of white mold snap bean with benomyl. **Plant Disease**, v. 62, p. 633-637, 1978.

HUNTER, J.E.; DICKSON, M.H.; CIGNA, J.A. Limited-term inoculation: a method to screen bean plant for partial resistance to white mold. **Plant Disease**, Saint Paul, v.65, p.414-417, 1981.

JAMAUX I, GELIE B, LAMARQUE C Early stages of infection of rapeseed petals and leaves by *Sclerotinia sclerotiorum* revealed by scanning electron microscopy. **Plant Pathology**, Saint Paul, v. 44, p.22–30, 1995.

KIM, H. S.; DIERS, B. W. Inheritance of partial resistance to *Sclerotinia* stem rot in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 55-61, 2000.

KIM, H. S.; HARTMAN, G. L.; MANANDHAR, J. B.; GRAEF, G. L.; STEADMAN, J. R.; DIERS, B. W.. Reaction of Soybean Cultivars to *Sclerotinia* Stem Rot in Field, Greenhouse, and Laboratory Evaluations. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 665–669, 2000.

KIMATI, Y.; BERGAMIN FILHO, A. Princípios gerais de controle. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2.

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.

LEITE, R.M.V.B. **Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja**. 2005. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/download/publicacao/comtec76.pdf>>. Acesso em 20 out. 2009.

LEONE, G.; TONNEIJCK, A.E.G. A rapid procedure for screening the resistance of beancultivars (*Phaseolus vulgaris*) to *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. **Euphytica**, Wageningen, v. 48, p. 87-90, 1990.

LOCH, L.C.; D'AVILA, L. Utilização de partículas de micélio seco de *Sclerotinia sclerotiorum* para inoculação de plantas de alface (*Lactuca sativa*). **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 20, p.129-130, 1994.

LUMSDEN RD, DOW RL Histopathology of *Sclerotinia sclerotiorum* infection of bean. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 63, p.708–715, 1973.



LUMSDEN, R. D. Histology and physiology of pathogenesis in plant diseases caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 890-895, 1979.

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

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

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 261-295, 1996.

MORAES FILHO, J.P. **Prospecção para safra 2007/08 – soja**. Brasília. 2007. 9p.

NELSON, B. D., HELMS, T. C., OLSON, M. A. Comparison of laboratory and field evaluations of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, n.7, p.662-665, 1991a.

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, 1991b.

NOYES, R. D.; HANCOCK, J. G. Role of oxalic acid in the *Sclerotinia* wilt of sunflower. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 18, p. 123-132, 1981.

NUNES JR., J. Relatos por Estado sobre o Comportamento da Cultura de Soja na Safra 2007/2008: Goiás. In: REUNIÃO DE PESQUISA DA SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 30., 2009. **Ata...** Londrina, EMBRAPA-Soja, 2009. Sessão 2.3, p. 24..Londrina: Embrapa Soja, 350 p., 2009.

PELTIER, A. J., HATFIELD, R. D.; GRAU, C. R. *Sclerotinia sclerotiorum* **does not detectably modify or metabolize lignin in mature soybean stems**. Disponível em:< <http://www.apsnet.org/meetings/div/nc04abs.asp>>. Acesso em: 10 nov. 2009.

PELTIER, A. J.; HATFIELD, R. D.; GRAU, C. R. Soybean stem lignin concentration relates to resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, p.149-154, 2009.

PENNYPACKER, B. W.; HATLEY, O. E. Greenhouse technique for detection of physiological resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, p.1178, 1995.

PENNYPACKER, B. W.; KNIEVEL, D. P.; RISIUS, M. L.; LEATH, K. T. Photosynthetic photon flux density × pathogen interaction in growth of alfalfa infected with *Verticillium albo-atrum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.84, p. 1350-1358, 1994.

PENNYPACKER, B. W.; RISIUS, M. L. 1999. Environmental sensitivity of soybean cultivar response to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.89, p.618-622, 1999.

PITOL, C. Relatos por Estado sobre o Comportamento da Cultura de Soja na Safra 2007/2008: Mato Grosso do Sul. In: REUNIÃO DE PESQUISA DA SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 30., 2009. **Ata...** Londrina, EMBRAPA-Soja, 2009. Sessão 2.3, p. 24..Londrina: Embrapa Soja, 350 p., 2009.

PRATT, R. G., ROWE, D. E. Evaluation of simplified leaf inoculation procedures for identification of quantitative resistance to *Sclerotinia trifoliorum* in alfalfa seedlings, **Plant Disease**, Saint Paul, v.82, p. 1161-1164, 1998.

PRATT, R. G.; ROWE, D. E. Comparative pathogenicity of isolates of *Sclerotinia trifoliorum* and *S. sclerotiorum* on alfalfa cultivars. **Plant Disease**, Saint Paul, v.79, p.474-477, 1995.

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.

PRICE, K.; CALHOUN, J. Pathogenicity of isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary to several hosts. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p.232- 238, 1975.

PRIOR, G.D., OWEN, J.H. Pathological anatomy of *Sclerotinia trifolium* on clover and alfalfa. **Phytopathology**, Saint Paul, v,54, p.784-787,1963.

PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host ranges, geographic distribution and impact. **Phytopathology**, Saint Pau, v. 69, n. 8, p. 875-880, 1979.

*Received on November 20, 2000.*

REDFEARN, D. D., BUXTON, D. R.; DEVINE, T. E. Sorghum intercropping effects on yield, morphology, and quality of forage soybean. **Crop Science**. Madison, v. 39, p. 1380-1384, 1999.

RIDE, J. P. **Biochemical Plant Pathology**. In: Callow, J.A. (Ed.). Hoboken: John Wiley & Sons, p. 215-235, 1983.

RIOU, C.; FREYSSINET, G.; FEVRE, M. Production of cell wall-degrading enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 5, p. 1478-1484, 1991.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, n. 2, p. 195-206, 2006.

SCHWARTZ, H.F.; STEADMAN, J.R. Factors affecting sclerotium populations of, and apothecium production of, *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 68, p. 383-386, 1978.

STEADMAN, J.R. White mold – a serious yield-limiting disease of bean. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, n.4, p.346-350, 1983.

SUTTON, D.C.; DEVERAL, B.J. Studies on infection of beans (*Phaseolus vulgaris*) and soybean (*Glycine max*) by ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, Oxford, v.32, p.251-261, 1983.

THOMÉ, G.C.H.; MILACH, S.C.K.; CRUZ, R.P. da.; FEDERIZZI, L.C. Melhoramento para resistência parcial a moléstias fúngicas em cereais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 365-371, 1999

TRUTMAN, P.; KEANE, P.J.; MERRIMAN, P.R. Influence of environmental factors and sclerotial origin on parasitism of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Coniothyrium minitans*. In

PARKER, C.A. et al. (Eds). **Ecology and Management of soilborne plant pathogens**. St. Paul, Am. Phyt. Soc., 1985. cap. 5, p. 221-223.

TU, J. C. Modes of primary infection caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in navy bean. **Microbios**, Cambridge, v.57, p.85-91, 1989.

TU, J.C. Management of white mold of white beans in Ontario. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 73, p. 281-285, 1989.

UNIVERSITY OF MINNESOTA. **White Mold Life Cycle**. Disponível em:<[http://www.soybeans.umn.edu/crop/diseases/whitemold/white\\_mold\\_life.htm](http://www.soybeans.umn.edu/crop/diseases/whitemold/white_mold_life.htm)>. Acesso em: 09 dez. 2009.

VALE F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.R.; LIBERATO, J.R. QUANT – a software for plant disease severity assessment. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 8., 2003, Christchurch, New Zealand. **Proceedings...**, Christchurch, New Zealand, 2003.

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

VUONG , T. D., HOFFMAN, D. D., DIERS, B. W., MILLER, J. F., STEADMAN, J. R.; HARTMAN, G. L. Evaluation of Soybean, Dry Bean, and Sunflower for Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Crop Science**, Madison, v.44, p.777–783, 2004.

WEGULO, S. N., YANG, X. B., MARTINSON, C. A. Soybean cultivar responses to *Sclerotinia sclerotiorum* in field and controlled environment studies. **Plant Disease**, Saint Paul, v.82, p. 1264-1270, 1998.

YAMAGUCHI, T.; STREET, H.E. Stimulation of the growth of excised cultured roots of soybean by abscisic acid. **Annual Botanic.**, Elmont, v.41, n.17, p.1129-1133, 1977.

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.

ZANETTI, A.L. Relatos por Estado sobre o Comportamento da Cultura de Soja na Safra 2007/2008:Minas Gerais. In: REUNIÃO DE PESQUISA DA SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 30., 2009. **Ata...** Londrina, EMBRAPA-Soja, 2009. Sessão 2.3, p. 24..Londrina: Embrapa Soja, 350 p., 2009.

ZHOU, T.; G.J. BOLAND. Mycelial growth and production of oxalic acid by virulent and hypovirulent isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal Plant Science**, Ottawa , v. 21, p.93–99, 1999.

ZITO, R.K.; WRUCK, D.S.M.; FRONZA, V.; ARANTES, N.E; Reação de genótipos de soja à *Sclerotinia sclerotiorum*. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 27., 2005, Cornélio Procópio. **Anais...** Cornélio Procópio: Embrapa Soja, 2006. p. 362.

## ANEXOS

TABELA 1. Análise de variância para tamanho da lesão de *Sclerotinia sclerotiorum* em hastes de soja realizado em condições controladas de câmara de crescimento. UFU, Uberlândia, 2009.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Cultivar	11	33,82590	3,07508	7,55100	0,0000*
Repetição	4	2,05201	0,51300	1,26000	0,3002 <sup>ns</sup>
Erro	44	17,91859	0,40724		
CV (%) =	12,82				

\*Significativo a, 5% de significância, pelo teste de F <sup>ns</sup> Não significativo.

TABELA 2. Análise de variância para tamanho da lesão de *Sclerotinia sclerotiorum* em hastes de plantas de soja inoculadas por dois métodos e incubados realizado em condições controladas de câmara de crescimento. UFU, Uberlândia, 2009.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Cultivar	13	157,6461	12,1266	8,1780	0,0000*
Repetição	6	12,9206	2,1534	1,4520	0,1979 <sup>ns</sup>
Método	1	3970,8902	3970,8902	2677,7800	0,0000*
Cultivar x Método	13	144,14915	11,08840	7,47700	0,0000*
Erro	162	240,23045	1,48290		
CV (%) =	26,34				

\*Significativo a, 5% de significância, pelo teste de F, <sup>ns</sup> Não significativo.

TABELA 3. Análise de variância para número de escleródios em hastes de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum*, após 21 DAI. UFU, Uberlândia, 2009.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Cultivar	13	4,685579	0,360429	3,061	0,0011*
Repetição	6	0,138278	0,023046	0,196	0,9771 <sup>ns</sup>
Erro	78	9,185761	0,117766		
Total corrigido	97	14,00962			
CV (%) =	17,71				

\*Significativo a, 5% de significância, pelo teste de F, <sup>ns</sup> Não significativo.

TABELA 4. Análise de variância dos dados referentes à severidade de *S. sclerotiorum* em função do efeito do isolado e cultivar. UFU, Uberlândia, 2009.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Cultivar	17,00	64701,0291	3805,9429	395,1390	0,0000*
Isolado	6,00	78815,4074	13135,9012	1363,7890	0,0000*
Cultivar x isolado	102,00	128256,2116	1257,4138	130,5470	0,0000*
Repetição	2,00	13,3545	6,6772	0,6930	0,5009 <sup>ns</sup>
Erro	250,00	2407,9788	9,6319		
CV (%) =	5,30				

\*Significativo a, 5% de significância, pelo teste de F, <sup>ns</sup> Não significativo.

TABELA 5. Análise de variância para tamanho de lesão causada por *Sclerotinia sclerotiorum* inoculadas em hastes de soja no terço médio com auxílio de ferimento realizado na área experimental, UFU. Uberlândia, 2009.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	3	118,52120	39,50707	19,36900	0,00000*
Cultivar	17	125,75956	7,39762	3,62700	0,00020*
Erro 1	51	104,02258	2,03966		
Isolado	3	20,83729	6,94576	5,33100	0,00160*
Isolado x Cultivar	51	64,38669	1,26248	0,96900	0,53910 <sup>ns</sup>
Erro 2	162	211,05918	1,30283		
CV <sub>1</sub> (%) =	20,63				
CV <sub>2</sub> (%) =	16,49				

\*Significativo a, 5% de significância, pelo teste de F, <sup>ns</sup> Não significativo.

TABELA 6. Análise de variância para tamanho da lesão de *Sclerotinia sclerotiorum* em hastes de soja inoculadas com e sem ferimento no primeiro internódio em condições de campo. UFU, Uberlândia, 2009.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	3	2,385	0,795	4,622	0,0098*
Cultivar	9	3,6494	0,4055	2,358	0,0410*
Erro 1	27	4,6435	0,172		
Método	1	18,333	18,333	101,27	0,0000*
Método x Cultivar	9	2,5531	0,2837	1,567	0,1705 <sup>ns</sup>
Erro 2	30	5,4311	0,181		
C <sub>1</sub> (%) =	31,23				
CV <sub>2</sub> (%) =	32,04				

\*Significativo a, 5% de significância, pelo teste de F, <sup>ns</sup> Não significativo.

TABELA 7. Análise de variância incidência de plantas mortas provocadas pela *S. sclerotiorum* em hastes de soja, inoculadas com e sem ferimento no primeiro internódio em condições de campo. UFU, Uberlândia, 2009.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Cultivar	9	186,757	20,75078	3,313	0,0075*
Repetição	3	77,71597	25,90532	4,136	0,0155*
Erro	27	169,094	6,262741		
CV (%) =	61,08				

\*Significativo a, 5% de significância, pelo teste de F, <sup>ns</sup> Não significativo.

TABELA 8. Análise de variância para tamanho da lesão de *Sclerotinia sclerotiorum* em hastes de soja quando utilizado o método de inoculação: com e sem ferimento abaixo do último trifólio totalmente expandido. UFU, Uberlândia, 2009.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	3	28,86984	9,62328	13,40600	0,00000*
CULTIVAR	9	35,34492	3,92721	5,47100	0,00030*
Erro 1	26	18,66354	0,71783		
Método	1	65,37728	65,37728	53,35800	0,00000*
Método x cultivar	9	4,09192	0,45466	0,37100	0,94020 <sup>ns</sup>
Erro 2	31	37,98303	1,22526		
CV <sub>1</sub> (%) =	27,15				
CV <sub>2</sub> (%) =	35,47				

\*Significativo a, 5% de significância, pelo teste de F, ns Não significativo.

TABELA 9. Análise de variância para tamanho não colonizado após a inoculação de *S. sclerotiorum* por três métodos e inoculação dos métodos com e sem ferimento abaixo do primeiro trifólio totalmente expandido UFU. Uberlândia, 2009.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Cultivar	9	255,29	28,365	8,339	0,0000*
Bloco	3	11,435	3,8115	1,121	0,3588 <sup>ns</sup>
Erro	26	88,435	3,4013		
CV (%) =	12,24				

\*Significativo a, 5% de significância, pelo teste de F, <sup>ns</sup> Não significativo



TABELA 10. Análise de variância para tamanho da lesão de *Sclerotinia sclerotiorum* em hastes de soja inoculados por três métodos: corte, sem fermento e com fermento. UFU, Uberlândia, 2009.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	3	8,75189	2,91730	3,13000	0,04200*
Cultivar	9	20,27552	2,25284	2,41700	0,03680*
Erro 1	27	25,16344	0,93198		
Métodos	2	49,70815	24,85408	38,93300	0,00000*
Métodos x cultivar	18	14,03958	0,77998	1,22200	0,27390 <sup>ns</sup>
Erro 2	60	38,30240	0,63837		
CV <sub>1</sub> (%) =	14,73				
CV <sub>2</sub> (%) =	12,19				

\*Significativo a, 5% de significância, pelo teste de F, ns Não significativo.

TABELA 11. Análise de variância para tamanho da lesão de *Sclerotinia sclerotiorum* na segunda avaliação com oito DAI pelo método do corte de caule. UFU, Uberlândia, 2009.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Cultivar	9	38,166	4,2407	3,273	0,0081*
Bloco	3	29,485	9,8283	7,586	0,0008*
Erro	27	34,98	1,2955		
CV (%) =	12,69				

\*Significativo a, 5% de significância, pelo teste de F, ns Não significativo.

TABELA 12. Análise de variância para tamanho da lesão inoculado com *Sclerotinia sclerotiorum* através de duas metodologias com fermento no terço médio e corte. UFU, Uberlândia, 2009.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	3	80,88697	26,96232	13,19000	0,00000*
Cultivar	9	74,77155	8,30795	4,06400	0,00220*
Erro 1	27	55,19081	2,04410		
Método	1	305,68381	305,68381	159,17600	0,00000*
Método x Cultivar	9	33,99117	3,77680	1,96700	0,07980 <sup>ns</sup>
Erro 2	30	57,61243	1,92041		
CV <sub>1</sub> (%) =	13,53				
CV <sub>2</sub> (%) =	13,11				

\*Significativo, a 5% de significância, pelo teste de F, <sup>ns</sup> Não significativo

TABELA 13. Análise de variância para tamanho da lesão em hastes de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* por meio de duas metodologias com ferimento terço médio e corte na segunda avaliação. UFU, Uberlândia, 2009.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	3	214,91845	71,63948	13,95200	0,00000*
Cultivar	9	276,75243	30,75027	5,98900	0,00010*
Erro 1	27	138,63398	5,13459		
Método	1	1555,49522	1555,49522	248,05400	0,00000*
Métodoxcultivar	9	87,30936	9,70104	1,54700	0,17700 <sup>ns</sup>
Erro 2	30	188,12373	6,27079		
CV 1 (%) =	14,25				
CV 2 (%) =	15,75				

\*Significativo , 5% de significância, pelo teste de F, ns Não significativo