

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

INOCULATION METHODS TO *Sclerotinia sclerotiorum* REACTION RESISTANCE ON SOYBEAN

Fernando Cezar JULIATTI¹; Erika SAGATA²; David de Souza JACCOUD FILHO³; Breno Cesar Marinho JULIATTI⁴

1. Professor, Doutor, Instituto de Ciências Agrárias – Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Uberlândia – MG, Brasil; 2. Engenheira Agrônoma, Mestre em Fitopatologia -UFU, Pesquisadora da empresa Monsanto, Área de Quarentena Vegetal, Uberlândia, MG, Brasil; 3. Professor, Doutor, Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG - UEPG, Ponta Grossa, PR, Brasil.4-Mestrando em Fitopatologia – UFU, MG.

RESUMO: O Mofo Branco, *Sclerotinia sclerotiorum*, deve ser manejado por métodos de controle integrado, entre eles a resistência genética. O objetivo do trabalho foi avaliar e definir um método confiável na seleção de genótipos de soja com resistência ao mofo branco. Os testes foram conduzidos em dois ambientes distintos: em ambiente controlado, onde as plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação e levadas para o laboratório para serem inoculadas e incubadas em câmara de crescimento; e no campo, onde a doença está sujeita às condições ambientais adversas. 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-se que o melhor método de avaliação à resistência de genótipos de soja foi a inoculação realizada com fermento no terço médio das plantas em fase final de florescimento e início de enchimento dos grãos, com discos de BDA e avaliadas 14 dias após a inoculação. A cultivar que pode ser considerada como padrão de resistência foi a Emgopa 316, e os padrões de suscetibilidade foram a BRSMG Garantia e BRSMG 68 Vencedora.

PALAVRAS-CHAVE: Resistência genética. Métodos de inoculação. *Sclerotinia sclerotiorum*.

INTRODUÇÃO

A resistência de cultivares de soja à *Sclerotinia 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 ou ainda não foi relatada (CALLA, et al., 2009).

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 et al., (2002) identificaram diversos PIs com elevada resistência: 153.282, 189.931, 196.157, 398.367, 417.201, 423.818, e PI 561.331.

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 (CLINE; JACOBSEN, 1983; BOLAND; HALL, 1987; CHUN et al., 1987; PENNYPACKER et al., 1994).

Wegulo et al., (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 de valor intermediário, e as vezes não significativas.

Entretanto, ainda ocorrem algumas dificuldades para se obter um método de inoculação de *S. sclerotiorum*, que some facilidade, resultados positivos e repetibilidade. Frente a isso, o objetivo deste trabalho foi testar vários métodos de inoculação do fungo em soja e definir padrões de

resistência e suscetibilidade para seleção de populações segregantes.

MATERIAL E MÉTODOS

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

Isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*

Seis isolados do fungo 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.

Experimentos realizados em casa de vegetação

No método de inoculação com e sem ferimento em hastes de soja realizado em 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.

Em um 1º experimento, foram testadas 12 cultivares, em esquema de delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, onde cada planta foi considerada uma repetição. 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_4 - V_5 . No 2º experimento, ocorreu a semeadura, sendo que no desbaste foram deixadas três plantas por copo, sendo que as plantas foram inoculadas quando as plantas já se encontravam no estágio V_5 - V_6 . Foram testadas 14 cultivares, em esquema de delineamento

inteiramente casualizado, com sete repetições, onde cada planta representou uma repetição.

Experimentos realizados em condições de Laboratório

No momento da inoculação, as plantas foram levadas para o Laboratório de Micologia e Proteção de Plantas (LAMIP). Após, estas foram incubadas à temperatura de $22 \pm 3^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. O isolado utilizado nos dois experimentos foi o isolado de Jataí, já descrito por Garcia (2008). No experimento inicial, 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. Contudo em uma segunda etapa, 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. A avaliação do primeiro experimento, três dias após a inoculação (DAI), mensurou-se o tamanho da lesão causada pela *S. sclerotiorum*. E, para o experimento posterior, o mesmo foi realizado quatro DAI, com auxílio de uma régua transparente graduada em centímetros. Além de avaliar o tamanho da lesão, 21 DAI, foi quantificado o número de escleródios de cada planta inoculada. 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.

Também foi realizado um experimento utilizando folhas destacadas. 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 repetições. A inoculação foi em folha destacada, quando as plantas atingiram o estágio V_3 , 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 1). Antes da inoculação, os folíolos foram borrifados com água e a seguir receberam um disco de micélio de 6 mm, 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.

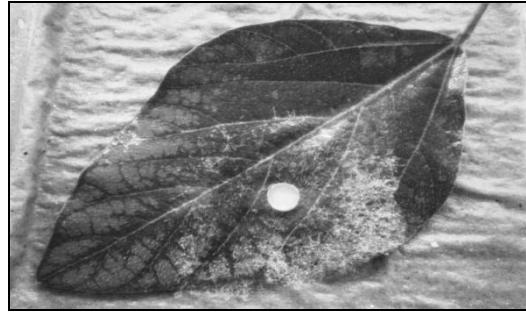


Figura 1. Inoculação com discos de BDA contendo micélio de *S. sclerotiorum* em folíolos destacados de soja. Fonte: Sagata (2009).

Para os ensaios com folhas destacadas 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).

Com base na severidade da doença (Figura 2), 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; JULIATTI, 2012).

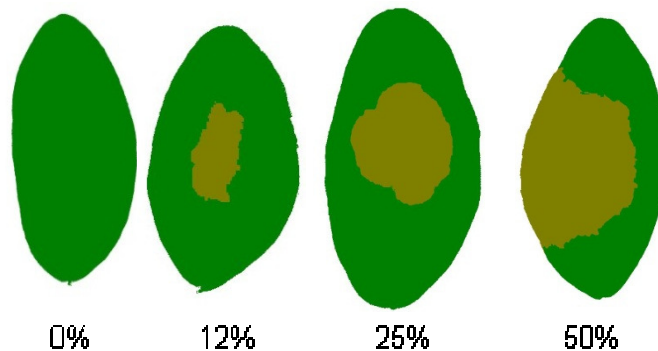


Figura 2. Escala diagramática para avaliação de sintomas de *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas inoculadas de plantas de soja (GARCIA; JULIATTI, 2012).

Experimentos realizados em condições de Campo

O experimento foi conduzido na área experimental da UFU, para a determinação de uma metodologia de inoculação para a seleção de genótipos de soja resistentes à *Sclerotinia sclerotiorum* em condições de campo. A semeadura foi a 20 cm e foram inoculadas 10 plantas por parcela, no período de inverno e com irrigação. A partir do teste realizado em campo, das 18 cultivares, escolheram-se as 5 mais resistentes e as 4 mais suscetíveis. Foram feitas várias inoculações, com diversas metodologias ao longo do desenvolvimento da cultura. O isolado utilizado foi o de Girassol, proveniente dos resultados da metodologia de folhas destacadas, na qual apresentou a maior agressividade. A inoculação foi realizada com disco de micélio de 6 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: 10 cultivares e 9 metodologias. Em cada parcela, a semeadura foi realizada no espaçamento de 45 centímetros, numa população de 12 plantas por metro, e em cada método avaliado foram inoculadas 10-12 plantas. Neste experimento foi realizado o método de inoculação com e sem ferimento no primeiro internódio. A inoculação foi realizada quando as plantas se encontravam no estágio entre V_4-V_5 . Dois métodos foram testados: método de inoculação no caule, provocando ferimentos com estilete, e sem ferimento entre a folha unifoliolar e o primeiro trifólio. Avaliou-se o tamanho da lesão (cm) causada pela *S. sclerotiorum* e a incidência de plantas mortas, quatorze DAI. Neste período, a precipitação média foi de 2,19 mm dia⁻¹, 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⁻¹. Devido ao longo

período de estiação, foram necessárias irrigações freqüentes de 2 mm dia⁻¹, 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.

Na aplicação do método de inoculação com e sem fermento abaixo do primeiro trifólio totalmente expandido, a inoculação foi realizada quando as plantas estavam no estádio entre V₆-V₇ e a M-SOY 2002 no estádio R₁. No quarto DAI, foi realizada a avaliação do tamanho da lesão. Não havendo precipitação nos quatro dias seguintes após a inoculação e a temperatura média máxima foi de 30,86°C e mínima de 21,96° C, então foram necessárias irrigações durante este período. Para tanto, utilizou-se uma lâmina de água de 2 mm dia⁻¹. Com relação ao disco de micélio, este foi fixado no internódio logo abaixo da folha trifoliada aberta, nos dois métodos de inoculação na haste de soja, com fermento e sem fermento.

Foram também testados métodos de inoculação na haste com e sem fermento, no internódio logo abaixo do meristema apical. Na inoculação utilizando corte, o caule principal das plantas foi horizontalmente cortado com uma lâmina no nó do último trifólio totalmente expandido, e um

disco de micélio foi colocado sobre o caule cortado e fixado por fita adesiva durex. A inoculação foi realizada quando as plantas se encontravam nos estádios entre V₉ a R₂, dependendo da cultivar. A primeira avaliação do tamanho da lesão foi aos 5 DAI dos três métodos de inoculação, e a segunda avaliação 8 DAI.

Foi realizada uma comparação entre os métodos de corte do caule principal e inoculação das hastes de soja com fermento entre o 4° e o 5° internódio (médio). Nesta, dois métodos de inoculação foram testados: inoculação com fermento na haste, entre o 5-6° internódio, e o método do corte de caule. A avaliação do tamanho da lesão na haste foi realizada 7 e 14 DAI. As plantas foram inoculadas nos estádios entre R₂ e R₄.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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 1).

Tabela 1. Tamanho da lesão, número de escleródios e % de redução no progresso ou tamanho da lesão, em condições de laboratório. UFU, Uberlândia, 2012.

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
Média	9.12 A*	0.12B**	3,40	4,62	

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 fermento na haste; ** Sem Ferimento na haste.

Segundo Pratt (1991), alguns métodos de inoculação podem exigir fermentos 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 (3°- 4°) inoculado era mais lignificado, segundo Peltier (2009). Estes observaram que os nós do terceiro trifólio apresentaram 142,4 g kg⁻¹ de tecido de caule, maior que o nó do quarto trifólio totalmente expandido (130,0 g kg⁻¹), e não diferiram

dos internódios entre o 3º e o 4º trifólio (I^{3-4}) e internódio entre o 2º e o 3º trifólio (I^{2-3}), sendo que o nó do quarto trifólio apresentou menor concentração de lignina, diferindo do nó do terceiro trifólio e do I^{2-3} e I^{3-4} .

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 1).

Em trabalhos conduzidos por Vuong et al., (2004), houve diferenças significativas na formação de escleródios dentro do caule da cultivar 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 fermento, 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 et al., (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.

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. Price e Calhoun (1975) compararam a patogenicidade de 14 isolados de *S. sclerotiorum* em 11 hospedeiros diferentes e a soja não foi incluída. Estes 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 2).

Tabela 2. Reação de cultivares de soja à diferentes isolados de *S. sclerotiorum* pelo método da folha destacada. Uberlândia, 2012.

Cultivar	Isolados							
	ABC	Campo Alegre	Girassol	Índia-nópolis	Jataí	Patos	Romaria	Médias
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	23,33 ^a	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
Médias	47,11E	32,70F	78,13A	53,76D	62,30C	73,78	61,46 C	58,46

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 2). Folhas da cultivar Emgopa 316 inoculadas com o isolado de Jataí apresentaram 23,33% de severidade (MR – moderadamente resistente), enquanto as demais foram MS- moderadamente suscetível e S - suscetível (Tabela 2), 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 trabalhos desenvolvidos por outros autores (CHUN et al., 1987; KIM et al, 2000), estimou-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 et al., (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 resistentes, enquanto que as demais foram suscetíveis.

Com relação a determinação de metodologia de inoculação para a seleção de genótipos de soja resistentes à *S. sclerotiorum* em condições de campo, quando utilizou-se o método de inoculação com e sem ferimento no primeiro internódio, 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.

Foram contabilizadas plantas mortas, sendo que todas as mortes foram resultantes de inoculação com *S. 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. 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 3).

O método de inoculação sem ferimento, inoculando-se as plantas no primeiro internódio mostrou-se inadequado ao avaliar os genótipos quanto à resistência.

Quando as plantas foram inoculadas com auxílio de fermentos no caule estas 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 3). 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, 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.

Tabela 3. 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. Uberlândia, 2012.

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
Média	3,19 A	0,26 B	1,73	

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.

Com relação ao método de inoculação com e sem ferimento abaixo do último trifólio totalmente expandido em condições de campo (Tabela 4), 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 ($T_{máx}$ média= 31°C e T_{min} . 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. O fungo produz numerosas enzimas de plantas que degradam componentes da parede celular (HEGEDUS e RIMMER, 2005; LUMSDEN, 1979.), contudo, enzimas de degradação de lignina não foram relatados para *S. sclerotiorum* (PELTIER et al., 2009).

Tabela 4. Tamanho da lesão em hastes de soja, quando utilizado o método de inoculação com e sem ferimento abaixo do último trifólio totalmente expandido. Uberlândia, 2012.

Cultivares	Com ferimento	Sem ferimento	Médias
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
Médias	4,02 A	2,22 B	3,12

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 média da lesão no método com ferimento foi 90,5% maior que a média do método de inoculação no caule sem ferimento. Portanto, este facilita a entrada e a colonização também será mais rápida na planta, onde já é proposto que a *Sclerotinia* penetra através da cutícula usando enzimas ou pela força mecânica, ou através de estômatos (PRIOR; OWEN, 1963).

O método de inoculação utilizando ferimento resultou em lesões maiores, em comparação ao método de inoculação sem ferimento, seguida pelo método do corte do caule (Tabela 5), 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. Neste, obteve-se 54,4% de

lesão maior que aquele obtido pelo método sem corte (Tabela 5).
ferimento, e 63,66% maior em relação ao método de

Tabela 5. Tamanho da lesão em hastes de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* por três métodos: corte, sem ferimento e com ferimento. Uberlândia, 2012.

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
Médias	5.71 C	6.68 B	7.27 A	6,55

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 sem ferimento, obteve 58,49% a mais de lesão em relação ao método de corte (Tabela 5). 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, 1979).

Ao testar 3 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 6).

Tabela 6. 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. Uberlândia, 2012.

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 et al., (2004) avaliaram as 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 et al., (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 14,81cm (BRSMG 68 Vencedora) (Tabela 6). Valores muito próximos aos que foram encontrados por Vuong et al., (2004) em materiais considerados padrões de resistência e suscetibilidade, sendo que o método utilizado foi o mesmo. 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).

CONCLUSÕES

O método de inoculação realizado com ferimento no terço médio das plantas que se encontravam no final do florescimento e início de enchimento dos grãos com discos de BDA mostrou-se com melhor resultado na avaliação à resistência de genótipos de soja.

A cultivar Emgopa 316 pode ser considerada com padrão de resistência e como padrão de suscetibilidade a BRSMG Garantia e BRSMG 68 Vencedora.

ABSTRACT: The Soybean stem white rot 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 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. 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. The resistance standard was Emgopa 316, while the susceptible standards were BRSMG Garantia and BRSMG68 Vencedora.

KEYWORDS: *S. sclerotiorum*. Inoculation methods. Soybean resistance.

REFERÊNCIAS

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- GARCIA, R.; JULIATTI, F. C. Avaliação da resistência de soja a *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes estádios fenológicos e períodos de exposição a inóculo. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 3, p. 196-203, 2012.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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, 1970.
- 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.
- 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.; 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.
- 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 alfafa. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 54, p. 784-787, 1963.

- 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.
- STEADMAN, J. R. White mold – a serious yield-limiting disease of bean. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, n. 4, p. 346-350, 1983.
- THOMÉ, G. C. H.; MILACH, S. C. K.; CRUZ, R. P. ; FEDERIZZI, L. C. Melhoramento para resistência parcial a moléstias fúngicas em cereais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 365-371, 1999.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.