

RANQUEAMENTO DE GENÓTIPOS DE SOJA COM RESISTÊNCIA PARCIAL POR DIFERENTES MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* SUBMETIDOS À ANÁLISE DE CORRELAÇÃO

RANKING OF SOYBEAN GENOTYPES WITH PARTIAL RESISTANCE FROM DIFFERENT INOCULATION METHODS OF *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* AND CORRELATION ANALYSIS BETWEEN PROCEDURES

Fernando Cezar JULIATTI¹; Erika SAGATA²; Breno César Marinho JULIATTI³

1-Professor Titular, Doutor, Laboratório de Micologia e Proteção de Plantas - LAMIP, Instituto de Ciências Agrárias - ICIAG, Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Uberlândia, MG, Brasil, juliatti@ufu.br; 2-Mestre em Fitopatologia, LAMIP - ICIAG - UFU, Uberlândia, MG, Brasil; 3-Mestrando em Fitopatologia - LAMIP - ICIAG - UFU, Uberlândia, MG, Brasil.

RESUMO: A podridão branca da haste da soja ou mofo branco tornou-se a segunda doença em importância na cultura no Brasil. Pouco se conhece sobre a resistência de soja ao patógeno. O objetivo do trabalho foi avaliar e definir um método confiável na seleção de genótipos de soja resistentes ao mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum*. O trabalho baseou-se em diferentes métodos de inoculação. Os testes foram conduzidos em ambiente controlado e à campo. Em condições de laboratório e câmara de crescimento sob condições ótimas de favorabilidade ótima e contínua ao patógeno e em campo com alternância de menor e maior favorabilidade ao mesmo. Para definir qual o melhor método de inoculação, como também os genótipos que possuem maior resistência parcial calcularam-se correlações pelo coeficiente de Spearman entre os métodos avaliados e métodos com o ranking geral das genótipos ou cultivares. O melhor método para avaliação da resistência de genótipos de soja ao mofo branco foi a inoculação realizada com ferimento no terço médio da planta onde estas se encontravam no final do florescimento e início de enchimento dos grãos, com discos de BDA e avaliadas 14 dias após a inoculação ($r_s=0,86$). A cultivar que poderá ser considerada com padrão de resistência em outros estudos foi a Emgopa 316, sendo o padrão de suscetibilidade a BRSMG Garantia e BRSMG 68 Vencedora, sendo este último o genótipo mais suscetível ao mofo branco.

PALAVRAS-CHAVE: *Glycine Max* (L) Merrill. Mofo branco. Avaliação da resistência. Métodos de inoculação. Padrões de resistência parcial.

INTRODUÇÃO

O fungo *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). O Brasil tem se tornado importante como produtor de soja e líder na exportação de grãos da leguminosa. Com esta nova situação de segundo maior produtor mundial têm-se observado 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). Esta doença deve ser manejada por métodos de controle integrado, entre eles a resistência genética. 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. Entretanto, sua utilização no controle da podridão branca da haste é limitada pela total escassez e desconhecimento do germoplasma brasileiro (SAGATA, 2010).

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). Esta 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). No entanto, é difícil de demonstrar no campo, devido à propensão das plantas em escapar da infecção (NELSON et al., 1991a).

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. A seleção de materiais resistentes às doenças é 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 triagem destes materiais evitaria este problema, conduzindo os experimentos em casa de vegetação e laboratório, 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 muitos testes em casa de vegetação / laboratórios devam ser exaustivamente testados para que um método possa ser considerado confiável para a correta identificação e caracterização da resistência no campo (RUSSEL, 1978).

O objetivo do trabalho foi avaliar e definir um método confiável na seleção de genótipos de soja resistentes ao mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de isolados.

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. 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 hipoclorito de sódio 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 foi sempre proveniente de escleródios.

Inoculações.

Experimentos em Câmara de crescimento com folhas destacadas em condições de controladas (câmara de crescimento – $20-22^\circ\text{Celsius}$) de laboratório

A inoculação foi realizada através de folhas destacadas de plantas cujo experimento foi instalado no período de inverno (maio e junho), 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. Quando as plantas atingiram o estágio V3, o folíolo central de três plantas, escolhidas aleatoriamente e correspondentes ao 2º trifólio, foi coletado e levado ao laboratório para montagem do ensaio. Três folíolos foram colocados em caixas de gerbox, separadamente, contendo quatro folhas de papel toalha umedecidas em água destilada estéril. 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, de cada isolado. As caixas gerbox contendo os folíolos foram incubadas à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, durante 72 horas.

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 1), 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%).

Experimentos em casa de vegetação e câmara de crescimento

Na etapa de 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 (duas partes de substrato para uma parte de material contendo argila e areia). Nesta etapa, foram conduzidos dois experimentos em duas condições de cultivo diferenciados e em períodos diferentes.



Figura 1. Escala diagramática para avaliação de sintomas de *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas inoculadas de plantas de soja (GARCIA; JULIATTI, 2008).

No primeiro experimento foram avaliadas 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 V4-V5.

Em um segundo experimento, as plantas foram semeadas deixando três plantas por vaso de 500 ml contendo solo:substrato orgânico (1:2), sendo estas inoculadas quando encontravam no estágio V5-V6. Foram testadas 14 cultivares, em esquema de delineamento inteiramente casualizado, com sete repetições, onde cada planta representou uma repetição. Em seguida foi realizado um ensaio de 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, estas foram incubadas à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas.

O isolado preliminar utilizado nos dois experimentos foi o isolado de Jataí - GO, já descrito por Garcia (2008). Para a inoculação no primeiro 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. Já, para o segundo 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.

A avaliação do primeiro experimento foi feita três dias após a inoculação (DAI), medindo o tamanho da lesão (cm) causada pela *S. sclerotiorum* com auxílio de uma régua transparente graduada em centímetros. Para o segundo experimento, o mesmo

procedimento da avaliação descrita acima foi realizado quatro DAI. Além de avaliar o tamanho da lesão, 21 DAI, foi quantificado o número de escleródios para cada planta inoculada, abrindo-se a haste principal.

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.

Experimentos em condições de campo e irrigação suplementar

Plantas semeadas no período de inverno (maio) e no espaçamento de 25 cm (15 plantas por metro linear) foram estabelecidas em cam experimental usando-se inoculação com ferimento no terço médio da planta, foram utilizadas as cultivares: M-SOY 2002, M-SOY 8008 e M-SOY 8352, M-SOY 8001, Emgopa 316, M-SOY 8000, Pioneer, MG/BR 46 Conquista, M-SOY 8360, BRSMG 68 Vencedora, BRS Favorita RR, UFUS-Tikuna, M-SOY 8527, UFUS-Capim Branco, UFUS-Carajás, UFUS-Guará, UFUS-Impacta e UFUS-Mineira.

A inoculação foi realizada com disco de micélio de seis mm de diâmetro e com cinco dias de idade fixados por fita adesiva entre o 4º-5º internódio sendo todas perfuradas com estilete. Para o molhamento das plantas no campo, foi feita a irrigação de 2 mm.dia^{-1} após a inoculação, sendo este procedimento executado em períodos mais quentes do dia, até o momento da avaliação.

A avaliação foi realizada quatro dias após a inoculação (DAI), mensurando-se as lesões, com auxílio de uma régua transparente graduada em centímetros.

Ensaio de campo com genótipos previamente selecionados de ensaios anteriores e irrigação suplementar.

Em condições de campo foram testadas outras metodologias de inoculação para a seleção de genótipos de soja resistentes à *Sclerotinia sclerotiorum*, sendo estes conduzidos na área experimental da UFU. Foram selecionados a partir dos ensaios anteriores cinco mais resistentes e as quatro mais suscetíveis. Os genótipos foram semeados no espaçamento a 25 cm, com 15 sementes por metro linear.

O isolado utilizado foi obtido em sementes de Girassol (Uberlândia – MG), que segundo a metodologia de folhas destacadas, apresentou maior agressividade (item 2.1). A inoculação foi realizada com disco de micélio de seis mm de diâmetro e com cinco 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 (turno de rega de 3 em 3 h, no período diurno). O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados em esquema de parcelas subdivididas, em quatro reepições. Em cada método avaliado foram inoculadas 10 plantas.

Realizaram-se sete metodologias de inoculação dentre as disponíveis na literatura: 1- Corte transversal da haste no terço médio e superior (retirada do terço superior das plantas e inserção de um disco de micélio do fungo); 2- Deposição do disco de micélio com o fungo em haste não cortada. As plantas foram inoculadas no estádio V9-V10 (BRSMG Garantia e M-SOY 8527, BRS Favorita RR, M-SOY 8000) e estádio R1(MG/BR 46 Conquista, M-SOY 8001, BRSMG 68 Vencedora, M-SOY 8352) e R2 (Emgopa 316, M-SOY 2002). Na ausência do corte o disco foi preso a mesma com uma fita durex; 3- Inoculação com e sem ferimento (estiletadas na haste seguida de deposição do disco de inóculo), no primeiro internódio. A inoculação foi realizada quando as plantas se encontravam no estádio entre V4-V5 e 4- Inoculação no caule com ferimento, e o sem ferimento entre a folha unifoliolar e o primeiro trifólio; 5- Inoculação com e 6- sem ferimento abaixo do primeiro trifólio apical totalmente expandido que foi realizada quando as plantas estavam no estádio entre V6- V7 (exceto para a cultivar M-SOY 2002 no estádio R1). O sétimo método consistiu no corte do caule principal e inoculação das hastes de soja com ferimento entre o 4º e o 5º internódio (Médio).

Avaliou-se o tamanho da lesão causada pela *S. sclerotiorum* e a incidência de plantas mortas, quatorze DAÍ. No quarto DAI, foi realizada a

avaliação do tamanho da lesão. A temperatura média máxima foi de 30,86°C e mínima de 21,96°C. Foram necessárias irrigações durante este período, utilizando lâmina de água de dois mm.dia⁻¹, durante todo o período experimental.

A avaliação do tamanho da lesão foi aos oito DAI. Neste período (sexto ao oitavo dia) ocorreram chuvas médias de 21 mm dia⁻¹ e temperatura máxima de 26,5°C e mínima de 20,6°C, respectivamente. Avaliaram-se também o tecido não colonizado, após a inoculação de *S. sclerotiorum* foi realizada após 20 a 30 DAI. Com auxílio de uma régua, mensurou-se a haste principal a lesão que ainda não havia sido colonizada pelo fungo.

A avaliação do tamanho da lesão na haste foi realizada sete e quatorze DAI. As plantas foram inoculadas no estádio entre R2 (M-SOY 8527, BRSMG Garantia) e R3 (MG/BR 46 Conquista, M-SOY 8352, BRS Favorita RR), R4 (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⁻¹, com temperaturas médias máximas de 28,1°C e mínima de 19,9°C. Devido ao longo período de estiagem, foram necessárias irrigações frequentes de dois mm dia⁻¹, em horários alternados (manhã e tarde). Os dados foram submetidos à ANAVA, aplicando-se o teste de Scott-Knott, a 5% de significância, e as médias transformadas pela raiz de $x + 0,5$.

Análise de correlações entre as diferentes metodologias de inoculação e ambientes pelo método de Serman

Para definir os padrões de resistência e suscetibilidade em relação ao patógeno para futuros ensaios foi obtido o coeficiente de correlação de Spearman para verificar se há correspondência entre métodos de inoculação e entre métodos e a média do ranking das cultivares (média geral em relação a todos os métodos). Este procedimento foi adotado com vistas a definir as diferentes reações dos genótipos e das plantas nos diversos estádios de desenvolvimento e locais de inoculação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ranqueamento de genótipos para a reação de resistência à *Sclerotinia sclerotiorum*

Com relação ao ranking das cultivares (Tabela 1), a BRSMG 68 Vencedora, quando inoculada no ápice da planta apresentou-se como a mais suscetível. No entanto, em tecidos mais lignificados na base do caule, ela se comportou como resistente. Já BRSMG Garantia foi suscetível,

independente da localização do inóculo na planta. Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Zito et al., 2006, que observaram em casa de vegetação e laboratório, respostas que variam desde elevada resistência até completa suscetibilidade.

A cultivar BRS Favorita RR e MG/BR 46 Conquista ficaram em posição intermediária, alternando algumas vezes como um dos genótipos que apresentaram resistência horizontal. A Emgopa 316 foi a cultivar que, na média geral do ranking, ficou em caracterizado como genótipo de maior

resistência parcial ou horizontal. Na maior parte dos experimentos a cultivar apresentou sempre uma menor reação ao patógeno, principalmente na redução do tamanho da lesão na haste. Isto indica que esta cultivar pode ser adotada como padrão de resistência para futuros trabalhos com o mesmo objetivo. 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).

Tabela 1. 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 (MrK)	
	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;

Segundo Wegulo et al., (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 nas reações de defesa entre as cultivares. Algumas cultivares podem variar quanto a sua estratégia de defesa, dependendo das condições ambientais ou o método de avaliação da resistência empregada e até mesmo a duração do período de florescimento.

Correlações de Spearman entre os diferentes métodos para definir genótipos com padrão de resistência e suscetibilidade

Por meio do ranking das cultivares, em todos os métodos avaliados no campo, calcularam-se os coeficientes de correlação de Spearman,

descritos na Tabela 2. A interpretação das correlações foi realizada comparando-se os métodos de inoculação e a média geral do ranking das cultivares.

Com relação ao 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 ao método de inoculação com ferimento no primeiro internódio ($r_s = 0,96$) (Tabela 2). A correlação entre a avaliação de incidência (número de plantas doentes ou que apresentaram sintomas após a inoculação) e o tamanho da lesão para o método de inoculação com ferimento foi de $r_s = 0,81$ (Tabela 2).

Tabela 2. Correlação do ranking das metodologias utilizadas para a seleção de genótipos resistentes à *Sclerotinia sclerotiorum*. UFU, Uberlândia, 2009.

		1º internódio				Último trifólio			3 métodos		2ªAv.		Ct e CF3º		2 avaliação			Av.			Cult.	
		Médi a	CF	SF	Inc.	Médi a	CF	SF	Média	CF	SF	Ct	Ct	Médi a	Ct	CF3º	Médi a	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		
2ªAv. Ct	Média											1.00	0.41	0.15	0.32	0.35	0.13	0.49	-0.16	0.65		
	Corte												1.00	0.38	0.95	0.84	0.14	0.96	0.02	0.85		
	CF3º													1.00	0.18	0.48	0.64	0.32	-0.18	0.59		
2ªav.Ct e CF3º	Média														1.00	0.82	0.13	0.94	0.24	0.71		
	Corte															1.00	0.54	0.92	0.26	0.82		
	CF3º																1.00	0.24	0.25	0.40		
T.N.C.	Av.																		1.00	-0.17		
MRk.	Cult.																				1.00	

CF = Com fermento; MRk. Média geral do ranking das avaliações dos métodos estudados pelo ranking por cultivar ; SF= Sem fermento ; Cult. = Cultivar; 1º internódio= Método de inoculação com e sem fermento 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 fermento abaixo do último trifólio totalmente expandido; 2ªAv.= Segunda avaliação; CF3º = Método de inoculação no caule com fermento no terço médio da planta; T.N.C. = Avaliação do tamanho de tecido não colonizado pelo fungo após a inoculação;

Já, no método de inoculação com e sem fermento abaixo do último trifólio totalmente expandido em experimento conduzido em condições de campo, obteve uma interação não significativa com valor de $Pr > F_c$ 0.94 (Tabela 2). Na correlação de ranking, constatamos que os dois métodos com ($rs=0,88$) e sem fermento ($rs=0,84$) (Tabela 2) poderão ser usados na avaliação da resistência com isolados mais agressivos do fungo, como o obtido em sementes de Girassol. No entanto as diferenças entre as cultivares se deve à $rs=0,90$ ao uso de fermentos para uma uniformidade na invasão do fungo nos tecidos das plantas. O método de inoculação sem fermento logo abaixo do meristema apical teve correlação de $rs=0,76$ (Tabela 2), o que se pode inferir na menor quantidade de lignina nestes tecidos. Quando se avaliou o tecido não colonizado (ausência de micélio cotonoso branco), após a inoculação de *S. sclerotiorum* por três métodos (corte, com e sem fermento; e métodos com e sem fermento abaixo do primeiro trifólio totalmente expandido) obtiveram-se coeficientes de correlações baixos e negativos. Comparando-o com

outros métodos e com a média de ranking das cultivares, o coeficiente foi $rs = -0,17$ (Tabela 2).

Nos métodos de inoculação realizando o corte e fermento no terço médio das plantas na primeira avaliação (7DAI), ocorreu uma correlação de $rs = 0,95$ com o método de inoculação utilizando estilete (estiletadas), para os fermentos no terço médio da planta (Tabela 2). A primeira avaliação do método corte no caule mostrou correlação moderada de $rs = 0,64$ com a segunda avaliação (Tabela 1). Segundo Wegulo et al., (1998), utilizando o método de inoculação no caule com disco de micélio, em plantas de estágio R1 – R3, 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, resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho. Estes resultados demonstram a variabilidade entre os métodos de inoculação e avaliação da resistência ao patógeno, bem como a diversidade de resultados encontrados, quando se

busca uma padronização de métodos. No entanto, Vuong et al., (2004), pelo método de “cut-stem”, observaram lesões mensuradas após 14 DAÍ que as correlações em testes de casa de vegetação e a severidade da doença no campo variaram de $r_s = 0,47$ a $r_s = 0,80$. Os autores citam Kull et al., (2003) que este método de inoculação foi estatisticamente superior quando comparado às folhas destacadas e inoculação de cotilédones. Por esta técnica os pesquisadores conseguiram 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 2).

Quando realizou-se a 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 foi observada e pode ser demonstrada pelo coeficiente de correlação de $r_s = 0,92$, enquanto que o método corte no ápice a correlação obtida foi de $r_s = 0,54$ (Tabela 2).

Com relação aos 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 2) o coeficiente correlação de $r_s = 0,86$, utilizando qualquer método de inoculação com ou sem ferimento logo abaixo do primeiro trifólio (tecidos jovens e provavelmente sem ou com pouca lignina) e com folhas completamente expandidas. Contudo, o método com ferimento contribui melhor nas diferenças entre as cultivares, com correlação de $r_s = 0,79$ maior que $r_s = 0,68$ pelo uso do método sem ferimento. O coeficiente de correlação entre o método corte do caule ou o ferimento no terço

médio da planta da primeira avaliação foi de $r_s = 0,85$. Entretanto, o método de inoculação com ferimento no terço médio contribui mais na seleção das cultivares com coeficiente de correlação $r_s = 0,71$, maior que o método corte no ápice ($r_s = 0,59$). 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). Quando se realizou a segunda avaliação usando o método anteriormente (corte e ferimento no terço médio), obteve-se coeficiente de correlação de $r_s = 0,82$. Os autores demonstraram que o método de inoculação, no terço médio da planta com ferimento (estiletadas), contribui mais da média com o $r_s = 0,86$.

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

Diante dos resultados obtidos o presente trabalho permite concluir que o melhor método para avaliação da resistência parcial ou horizontal de genótipos de soja ao mofo branco foi a inoculação realizada com ferimento no terço médio superior da planta, durante o florescimento da ampla maioria dos genótipos.

A cultivar Emgopa 316 pode ser considerada como padrão de resistência parcial ao patógeno e BRSMG Garantia e BRSMG 68 Vencedora como padrões de suscetibilidade.

ABSTRACT: White mold or Sclerotinia stem rot is the second disease on soybeans in Brazil. In nowadays there is the lack of studies and inoculations methods to resistance in soybean genotypes his study evaluated and developed a reliable method for the selection of soybean genotypes resistant to white mold of soybean, also called *Sclerotinia* stem rot. The work was based on rating inoculations on the stem. 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 were used to measure the correspondence between ranks of cultivar and ranks of the same cultivars in field experiments to establish the best inoculation method. 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. The most susceptible genotype was BRSMG 68 Vencedora.

KEYWORDS: *Glycine Max* (L) Merrill. White mold. Resistance evaluation. Standard genotypes. Inoculation methods.

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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 ao inóculo. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 3, pag. 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

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.

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.

SAGATA, E. **Métodos de inoculação e avaliação da resistência de genótipos de soja à *Sclerotinia sclerotiorum***. 2010. 56f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Instituto de Ciência Agrárias - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

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

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.

ZITO, R.K.; et al. 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.