

# Uso de método do palito para inoculação de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, em soja

Amauri Siviero<sup>1</sup> & José O. M. Menten<sup>2</sup>

<sup>1</sup> EMBRAPA/CPAF-ACRE, Caixa Postal 392, Rio Branco - AC, CEP: 69.908-180.

<sup>2</sup> ESALQ/USP Dept. de Fitopatologia, Caixa Postal 09, Piracicaba, SP, CEP: 13.418-970.

Aceito para publicação em: 23/06/95.

## RESUMO

Siviero, A. & Menten, J.O.M. Uso de método do palito para inoculação de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, em soja. *Summa Phytopathologica*, v.21, p.259-260, 1995.

O cancro da haste da soja, causado por *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* Morgan-Jones (D.p.m.), é um sério problema no Brasil desde o seu aparecimento em 1989. A avaliação da resistência de cultivares ao patógeno exige metodologia apropriada, segura e objetiva. Quatro cultivares de soja foram testados para resistência a D.p.m. Plantas no estádio V<sub>1</sub> foram inoculadas através do método do palito e a avaliação da incidência da doença foi feita pela contagem do número de plantas mortas/murchas que se deu entre 15 a 20

dias após a inoculação. Os cultivares IAC-Foscarin 31 e Primavera são resistentes a *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* e podem ser utilizados como fontes de resistência ao patógeno em programas de melhoramento, enquanto, os cultivares Paraná e Forrest são suscetíveis a D.p.m. O método de inoculação usando o palito colonizado com o patógeno foi eficiente e seguro na discriminação da resistência dos genótipos de soja a *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*.

Palavras-chave: Metodologia, avaliação resistência, *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, soja.

## ABSTRACT

Siviero, A. & Menten, J.O.M. The toothpick as a method for inoculation of soybean plantlets with the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*. *Summa Phytopathologica*, v.21, p.259-260, 1995.

*Soybean stem canker, caused by Diaporthe phaseolorum f. sp. meridionalis Morgan-Jones (D.p.m.), was been a serious problem of soybean crops in Brazil since their first report in 1989. More accuated and precise methodological technics are needed to evalute pathogen resistant cultivars. This work was carried out under greenhouse conditions using toothpick method. Four genotypes resistant (IAC-Foscarin 31 and Primavera) and susceptible (Paraná and For-*

*rest) to D.p.m. were tested. The toothpick method was used to inoculate seedlings at V<sub>1</sub> stage. The disease was evaluated fifteen to twenty days after inoculation by counting the number of dead or wilt plants. The toothpick method was eficient and accurate in detection of the soybean genotypes for resistance to D.p.m.*

Key words: Metodology, resistance, *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, Soybean.

O cancro da haste da soja foi constatado, pela primeira vez no Brasil, no município de Ponta Grossa -PR, em fevereiro de 1989 e encontrado na safra 1989/90 em todas as áreas produtoras de soja do país (9). O fungo que causa a doença no Brasil é o mesmo que ocorre no sul do EUA, identificado como *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* Morgan-Jones [forma anamórfica: *Phomopsis phaseoli* f. sp. *meridionalis* Morgan-Jones] (6, 9).

Os sintomas da doença no campo se caracterizam por apresentar estrias castanho claras que progridem para manchas elípticas escuras ocorrendo nos entre-nós, nós, caule, pecíolos e medula das plantas. O ataque do patógeno pode provocar a morte parcial ou total das plantas afetadas (9).

A avaliação da resistência em genótipos de soja ao cancro da haste em programas de melhoramento, exige a adoção de métodos de inoculação e avaliação rápidos e eficientes (1). A principal desvantagem da avaliação em campo é a não ocorrência da doença em determinados anos devido a condições climáticas desfavoráveis. Uma alternativa seria a inoculação do patógeno em campo, porém, seria pouco prático e trabalhoso.

O método de inoculação com palito foi usado no sistema soja versus cancro da haste, pela primeira vez, por CRALL

(2) e sua eficiência foi comprovada posteriormente por diversos autores (1, 4, 5, 8, 9). O método do palito de dente colonizado com micélio do patógeno reduziu o tempo de avaliação de plantas de soja ao cancro da haste, economizou trabalho e espaço no campo, demonstrou também haver correlação entre os resultados obtidos no campo e em casa-de-vegetação (5).

Este trabalho teve como objetivo testar o método do palito de dente colonizado com micélio do fungo com isolado do Brasil, para avaliação da resistência de genótipos de soja a D.p.m.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados os cultivares de soja IAC-Foscarin-31, Primavera, Paraná e Forrest pertencentes à Coleção de Germoplasma da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo.

As plantas de soja a serem inoculadas foram cultivadas em vasos de alumínio com capacidade de 2,0 litros. O substrato usado foi constituído de solo-areia-esterco na proporção de (3:1:1). Em cada vaso foram distribuídas aproximadamente 12 sementes e, antes da inoculação, foi feito um desbaste deixando-se cinco plantas por vaso.

O inóculo foi produzido em palitos de dente colonizados com micélio do fungo. Os palitos foram cortados em dois pedaços e suas extremidades afinadas, visando diminuir o dano mecânico às plantas no momento da inoculação. Em seguida foram fervidos em água destilada por 30 minutos, com três trocas sucessivas de água, para a eliminação de possíveis agentes tóxicos às plantas ou algum inibidor fúngico. Antes de serem colocados em contato com o micélio do fungo, os palitos foram autoclavados à 120°C por 20 minutos.

O fungo foi repicado da cultura matriz em tubo, para placas de Petri contendo BDA; após quatro dias de incubação a 24 -26°C no escuro, transferiu-se cinco a seis discos de micélio medindo 5 mm de diâmetro para outra placa de petri com BDA. Os palitos a serem colonizados pelo fungo foram colocados nestas culturas (50 a 60 pedaços por placa) na posição vertical com a ponta afinada externa ao meio de cultura e incubados por quatro dias.

As plantas foram inoculadas no estádio VI (3), cerca de 10 dias após a sementeira, através da inserção direta do palito colonizado com o fungo a 1 cm abaixo do cotilédone da planta. As plantas, após a inoculação, foram mantidas em câmara úmida por 72 horas, sendo transferidas para bancadas na casa de vegetação até a avaliação. Cada inoculação foi realizada em intervalo de sete dias repetindo-se o mesmo procedimento acima descrito. Ao todo foram constituídos quatro lotes distintos de plantas submetidas a inoculação.

O delineamento experimental foi blocos ao acaso, com quatro tratamentos (genótipos) e quatro repetições. Em cada tratamento foram inoculadas 100 plantas, divididas em quatro repetições de 25 plantas. O preparo do inóculo foi iniciado oito dias antes da data de cada inoculação, fazendo-se coincidir o desenvolvimento da planta com a disponibilidade de inóculo.

A avaliação da doença foi feita através da contagem do número de plantas mortas ou murchas e posterior transformação em percentagem, entre 15 a 20 dias após a inoculação. Os dados originais de incidência (porcentagem de plantas mortas/murchas) foram transformados segundo a fórmula  $\sqrt{x} + 1$  e submetido a análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5 e 1%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro 1, são apresentados os dados originais da incidência do cancro da haste da soja dos genótipos testados para reação de resistência a *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*.

Os resultados apresentados no Quadro 1 confirmaram a reação de resistência a *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* dos cultivares "IAC-Foscarin-31" e "Primavera", bem como a reação de suscetibilidade dos cultivares "Paraná" e "Forrest", conforme relatado por (9).

A avaliação da quantidade de doença segundo o critério da incidência do cancro da haste em soja se mostrou eficiente, simples e objetiva para detectar a resistência dos genótipos testados, uma vez que identificou-se diferença significativa entre os genótipos.

Quadro 1. Reação de quatro genótipos de soja a *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*. Piracicaba - SP, 1992.

Genótipos <sup>1</sup>	Incidência <sup>2</sup>				Média <sup>3</sup>
	1	2	3	4	
IAC-Foscarin-31 (R)	00	12	00	08	05 a
Primavera (R)	08	12	00	04	06 a
Paraná (S)	92	80	56	44	68 b
Forrest (S)	100	100	88	80	92 b

<sup>1</sup> R = Resistente; S = Suscetível.

<sup>2</sup> % de plantas mortas/murchas.

<sup>3</sup> Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (cv = 12,74%).

O curto espaço de tempo (15 a 20 dias) para avaliação da resistência de genótipos é desejável, principalmente em programas de melhoramento onde um grande número de linhagens são testadas. O tempo para avaliação da reação de resistência foi consideravelmente reduzido. Outros autores citaram a necessidade de 30 a 40 dias para a avaliação de resistência de genótipos de soja ao cancro da haste (5, 7).

O método de inoculação, usando o palito de dente colonizado com micélio do patógeno, foi eficiente na discriminação dos materiais com relação a reação a D.p.m. Tal fato é importante, considerando-se a boa correlação entre o método do palito e a resposta dos cultivares ao nível de campo, como relataram (5, 7).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ALLEN, F.L. Breeding for resistance to stem canker. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 4., Buenos Aires, 1989. **Proceedings**. Buenos Aires Associação Argentina de la Soja, 1989. v.3, p.1155-60.
02. CRALL, J.M. A toothpick tip method of inoculation. In: ANNUAL MEETING OF THE APS, 43, Cincinnati, 1951. Abstracts. **Phytopathology**, St. Paul, v.42, p.5, 1952.
03. FEHR, W.R.; CAVINESS, D.T.; BURWOOD; J.S. PENNINGTON. Stage of development descriptions of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) **Crop Science**, Madison, v.11, p.829-31, 1971.
04. FROSHEISER, F.I. Studies of the etiology and epidemiology of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, the cause of stem canker of soybeans. **Phytopathology**, St. Paul, v.47, p.87-94, 1957.
05. KEELING, B.L. A seedlings test for resistance to soybean stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. **Phytopathology**, St. Paul, v.77, p.807-809, 1982.
06. MORGAN-JONES, G. The Diaporthe Phomopsis complex: taxonomic considerations. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 4., Buenos Aires, 1989. **Proceedings**. Buenos Aires: Association Argentina de la Soja, 1989. v.4, p.1694-706.
07. WEAVER, D.B.; SEDHOM, S.A.; SMITH, E.P.; BACHMAN, P.A. Field and greenhouse evaluations of stem canker resistance in soybean. **Crop Science**, Madison, v.28, p.626-30, 1988.
08. WENDEL, B.A.; ALLEN, F.L. Genetic control of stem canker resistance in soybeans. In: ANNUAL MEETINGS, 78, New Orleans. **Agronomy Abstracts**, v.87, Nov./Dez. 1986.
09. YORINORI, J.T. **Cancro da haste da soja**. Londrina: EMBRAPA/CNPSO, 1990. 7p. (EMBRAPA/CPNSO. Comunicado Técnico, 44).