



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA

VARIABILIDADE DE ISOLADOS DE *Fusarium* spp. CAUSADORES DA
PODRIDÃO VERMELHA DA RAIZ DA SOJA

PABLO R. P. DE MELO OLIVEIRA

Brasília, DF 2010

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA

VARIABILIDADE DE ISOLADOS DE *Fusarium* spp. CAUSADORES DA
PODRIDÃO VERMELHA DA RAIZ DA SOJA

PABLO R. P. DE MELO OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Departamento de
Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas
da Universidade de Brasília, como requisito parcial
à obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

Brasília, DF 2010

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob a orientação do Professor Luiz Eduardo Bassay Blum, com apoio institucional e bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Aprovado em 30/10/2010, por:

Prof. Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum
Orientador
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Adalberto Café Filho
Examinador
Universidade de Brasília

Dr. Alexei de Campos Dianese
Examinador
EMBRAPA/Cerrados

DEDICATÓRIA

A Deus e aos meus familiares, em especial a
meu pai e a minha avó Hilda.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum, por sua ajuda, paciência e confiança.

Ao doutor Alexei de Campos Dianese, pela co-orientação, por todo apoio, tanto profissional quanto emocional.

Aos pesquisadores da Embrapa: Dr. Rodrigo Fragoso, Dr. Fábio Faleiro, Dr. Fábio Bueno, Dr. Austerclínio Farias Neto, Dra. Marta Aguiar.

A Dra. Valácia Lemes da Silva Lobo minha orientadora.

A minha professora Dra. Eliane Toledo

Ao professor Dr. Adalberto Café Filho.

Aos professores do curso de pós-graduação em Fitopatologia por todos os ensinamentos.

A todos meus amigos da pós-graduação em especial a Dina Márcia, Jessica, Cecília, Niday, Edivânio, Roberta, Maria, Daniel, Thiago, Érica, Ana Paula, Andressa, Maíra, Leonardo, Magno, Fabiane, Claudênia, Liamar, Justino, Mikhail, Mônica, Natália Priscila, Leila, Kamila, Fernanda, Wilian, Eugênio, Klénia.

A todos os funcionários departamento de Fitopatologia e aos funcionários da Embrapa Cerrados pela ajuda.

Aos todos meus amigos.

A minha Família.

A Deus.

SUMÁRIO

Apresentação	i
Dedicatória	iii
Agradecimentos	iv
Resumo	ix
Abstract	x
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
Introdução	1
Cultura da Soja	1
Podridão Vermelha da Raiz da Soja	6
Etiologia	7
Sintomatologia	9
Epidemiologia	10
Controle	12
Referências Bibliográficas	17
CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DE SEVERIDADE DA PODRIDÃO VERMELHA DA RAIZ EM SOJA CAUSADA POR ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> spp.	
Resumo	23
Introdução	24
Materiais e Métodos	27
Resultados e Discussão	30

Referências Bibliográficas	36
CAPÍTULO 3 - DETERMINAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> spp. CAUSADORES DA PODRIDÃO VERMELHA DA RAIZ EM SOJA	
Resumo	38
Introdução	39
Materiais e Métodos	42
Resultados e Discussão	46
Referências Bibliográficas	54
Anexos - Características de <i>Fusarium brasilienses</i> , <i>F. cuneirostrum</i> , <i>F. virguliforme</i> e <i>F. tucumaniae</i> , segundo Aoki (2005) e Aoki (2003).	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sintomas da podridão vermelha da raiz (PVR). Podridão radicular (1), sintomas foliares iniciais (2), que posteriormente se tornam mais severos e chamados de “folha carijó” (3 e 4).

Figura 2. Ciclo da podridão vermelha da raiz (PVR).

Figura 3. Esquema do processo de inoculação para a avaliação da severidade de isolados de *Fusarium* spp. causadores da PVR.

Figura 4. Sistema radicular das plântulas de soja, mostrando a diferença entre as plantas inoculadas (esquerda) e o controle (direita).

Figura 5. Análise de agrupamento de 57 isolados de *Fusarium* spp. com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando 1423 marcadores moleculares RAPD. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.

Figura 6. Perfis de RAPD dos isolados estudados de *Fusarium* spp. amplificados com o primer OPG – 17.

Figura 7. Análise de RAPD das amplificações como os primers, OPA - 3 e OPG -17, dos isolados de *Fusarium* spp. estudados, gerados pelo programa Bionumerics.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação dos valores médios percentuais da perda de massa seca da raiz de plântulas de soja inoculadas com isolados de *Fusarium* spp. causadores da podridão vermelha da raiz (PVR), em casa de vegetação (Embrapa Cerrados – Planaltina, DF).

Tabela 2. Relação de isolados da coleção de *Fusarium* spp, utilizados no experimento, com seus números de identificação e respectivos locais de coleta e espécies.

Tabela 3. Componentes da reação de amplificação do DNA de *Fusarium* spp. e respectivas concentrações utilizadas em uma reação.

Tabela 4. Componentes com quantidade e respectivas concentrações utilizadas no preparo da solução tampão CTAB.

Tabela 5. Matriz de distância genéticas obtidas com base no complemento de coeficiente de similaridade segundo o coeficiente de Jaccard entre 57 isolados de *Fusarium* spp. estudados, elaborado a partir dos loci polimórficos obtidos com o conjunto de primers.

RESUMO

A soja é a oleaginosa mais cultivada no mundo e possui um papel importantíssimo na alimentação humana. Além da importância direta na nutrição da população mundial, esse grão é também utilizado de diversas outras formas como, por exemplo, na produção de óleo, ração animal e biocombustíveis. Devido a esses aspectos a soja tornou-se muito importante na economia mundial e é o produto agrícola mais exportado no Brasil. Dentre os aspectos limitantes para a cultura estão as doenças, entre elas, a podridão vermelha da raiz (PVR) que é responsável por grandes perdas na produtividade da soja. Como agentes causais dessa doença são consideradas quatro espécies de *Fusarium*: *F. brasiliense*, *F. cuneirostrum*, *F. tucumaniae* e *F. virguliforme*. Através de uma coleção de isolados de *Fusarium* spp. oriundos de diversas regiões produtoras de soja no Brasil, foi desenvolvido esse projeto, que teve como objetivo verificar a variabilidade genética desses isolados, bem como a severidade causada pela PVR em cultivares de soja moderadamente resistente e suscetível a essa doença. Através dos testes de severidade ficou comprovado que todos isolados causaram danos significativos no sistema radicular das plântulas. Para avaliação da variabilidade genética dos isolados, foram realizadas análises de polimorfismos de DNA amplificado ao acaso (RAPD). Onde se constatou uma grande diversidade genética entre os isolados e uma tendência clara de separação em dois grupos principais das duas espécies prevalentes no Brasil, *F. tucumaniae* e *F. brasiliense*.

ABSTRACT

Soybean is the crop most widely grown in the world and has an important role in human nutrition. Besides the direct importance in the nutrition of the world population, this grain is also used in many other ways, such as in oil production, animal feed and production of biofuels. Due to these factors, soybean became important in the global economy and is the most exported agricultural product in Brazil. The diseases are among the limiting factors on soybean production. One of these diseases is the sudden death syndrome (SDS) that is responsible for losses on crop yield. As causative agents of disease, four species of *Fusarium* are considered pathogens: *F. brasiliense*, *F. cuneirostrum*, *F. tucumaniae* and *F. virguliforme*. This work was conducted by studying a collection of *Fusarium* spp. from different soybean-producing regions in Brazil. The main objective of the research was to determine the genetic variability of these isolates as well as the severity caused by the SDS on cultivars moderately resistant and susceptible to the disease. The tests of disease severity, throughout artificial inoculation, have shown that all isolates caused significant damage in the seedling root system. To assess the genetic variability of isolates were carried out analysis of polymorphisms of DNA randomly amplified (RAPD). RAPD analysis demonstrated a great genetic diversity among the isolates and a clear tendency to split into two main species-groups, *F. tucumaniae* and *F. brasiliense*, both species prevalent in Brazil.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. CULTURA DA SOJA

A soja pertence à classe das dicotiledôneas, família Fabaceae, à subfamília Faboideae e ao gênero *Glycine* Willd. A espécie cultivada é a *Glycine max* Merrill, cujo sistema radicular é pivotante, com a raiz principal bem desenvolvida e raízes secundárias em grande número, ricas em nódulos de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico. São tetraplóides diploidizados ($2n = 40$), ou seja, um poliplóide com comportamento meiótico de um diplóide normal e são facilmente cruzadas (EMBRAPA SOJA, 2004).

É uma planta herbácea que possui as seguintes características: anual, ereta, com desenvolvimento morfológico diversificado, com hastes e vagens pubescentes. A altura varia de 0,3 a 2,0 m podendo ser mais ou menos ramificada. Dependendo da cultivar e condições ambientais, o ciclo da soja pode variar de 80 a 200 dias (Sediyama et al., 1985). Vagens levemente curvadas e usualmente achatadas, 3-15 x 1 cm, deiscentes, contendo (1)-2-3(-5) sementes. As sementes são geralmente esféricas, amarelas, verdes, marrom ou preta, com hilo pequeno. Folhas alternadas, trifolioladas, pecíolo longo, especialmente nas folhas baixas, folíolos ovais a lanceolados, medindo 3-10 x 2-6 cm (CAB, 2005).

A soja é uma cultura cuja origem se atribui ao continente asiático, sobretudo a região do rio Yangtze, na China, é conhecida como um grão sagrado e explorada intensamente na dieta alimentar do Oriente a mais de cinco mil anos. A soja hoje cultivada mundo afora é muito diferente dos ancestrais que lhe deram origem. Nos seus

primórdios, a soja era uma planta rasteira, sua evolução ocorreu de plantas oriundas de cruzamentos naturais entre duas espécies de soja selvagens, que foram domesticadas e melhoradas por sábios da antiga China (EMBRAPA SOJA, 2004).

A partir da sua origem no Norte da China, a soja expandiu-se de maneira lenta para o Sul da China, Coréia, Japão e Sudeste da Ásia por volta de 200 a.C. e o século III d.C. No Ocidente a soja apareceu no final do século XV e início do século XVI, com a chegada dos navios europeus à Ásia. Permaneceu como curiosidade nos jardins botânicos da Inglaterra, França e Alemanha durante os quatro séculos que se seguiram (Morse, 1950).

Foi somente no século XVIII que pesquisadores europeus iniciaram estudos com a soja como fonte de óleo e nutriente animal, e no início do século XX passou a ser cultivada comercialmente nos Estados Unidos. Na segunda década do século XX, o teor de óleo e proteína do grão começou a despertar o interesse das indústrias mundiais. Entretanto, as tentativas de introdução comercial do cultivo do grão na Rússia, Inglaterra e Alemanha fracassaram, provavelmente, devido às condições climáticas desfavoráveis (EMBRAPA SOJA, 2000).

Os Estados Unidos (EUA) iniciaram sua exploração comercial (primeiro como forrageira e, posteriormente, como grão). Em 1940, no auge do seu cultivo como forrageira, foram cultivados, nesse país, cerca de dois milhões de hectares com tal propósito. A partir de 1941, a área cultivada para grãos superou a cultivada para forragem, cujo cultivo declinou rapidamente, até desaparecer em meados dos anos 60, enquanto a área cultivada para a produção de grãos crescia de forma exponencial, não apenas nos EUA, como também no Brasil e na Argentina, principalmente (EMBRAPA SOJA, 2004).

No Brasil a soja foi introduzida por Gustavo Dutra, na Bahia em 1882, entretanto sem sucesso, pois os germoplasmas trazidos dos Estados Unidos não eram adaptados para condições de baixa latitude (12°S). Gustavo Dutra, então professor da Escola de Agronomia da Bahia, realizou os primeiros estudos de avaliação de cultivares introduzidas daquele país. Em São Paulo (latitude de 23°S), foi cultivada pela primeira vez por Daffert, em 1892, no Instituto Agronômico de Campinas. Em São Paulo, novos materiais foram testados e neste caso, teve relativo êxito na produção de feno e grãos (Sediyama et al., 1985; Kiihl, 2006; Seixas et al., 2006).

Em 1891, testes de adaptação de cultivares semelhantes aos conduzidos por Dutra na Bahia foram realizados no Instituto Agronômico de Campinas, Estado de São Paulo (SP). Assim como nos EUA, a soja no Brasil dessa época era estudada mais como cultura forrageira - eventualmente também produzindo grãos para consumo de animais da propriedade - do que como planta produtora de grãos para a indústria de farelos e óleos vegetais (EMBRAPA SOJA, 2004).

Em 1900 e 1901, o Instituto Agronômico de Campinas, SP, promoveu a primeira distribuição de sementes de soja para produtores paulistas e, nessa mesma data, têm-se registro do primeiro cultivo de soja no Rio Grande do Sul (RS). Nesta região a cultura encontrou efetivas condições para se desenvolver e expandir, dadas as semelhanças climáticas do ecossistema de origem (sul dos EUA), dos materiais genéticos existentes no País, com as condições climáticas predominantes no extremo sul do Brasil. Com o estabelecimento do programa oficial de incentivo à triticultura nacional, em meados dos anos 50, a cultura da soja foi igualmente incentivada, por ser, desde o ponto de vista técnico (leguminosa sucedendo gramínea), quanto econômico (melhor aproveitamento da terra, das máquinas/implementos, da infra-estrutura e da mão de obra). Sendo a

melhor alternativa de verão para suceder o trigo cultivado no inverno (EMBRAPA SOJA, 2004).

No final da década de 60, dois fatores internos fizeram o Brasil começar a enxergar a soja como um produto comercial, fato que mais tarde influenciaria no cenário mundial de produção do grão. Na época, o trigo era a principal cultura do Sul do Brasil e a soja surgia como uma opção de verão, em sucessão ao trigo. O Brasil também iniciava um esforço para produção de suínos e aves, gerando demanda por farelo de soja. Em 1966, a produção comercial de soja já era uma necessidade estratégica, sendo produzidas cerca de 500 mil toneladas no País (EMBRAPA SOJA, 2000).

A explosão do preço da soja no mercado mundial, em meados de 1970, desperta ainda mais os agricultores e o próprio governo brasileiro. O País se beneficia de uma vantagem competitiva em relação aos outros países produtores: o escoamento da safra brasileira ocorre na entressafra americana, quando os preços atingem as maiores cotações. Desde então, o país passou a investir em tecnologia para adaptação da cultura às condições brasileiras, processo liderado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA SOJA, 2004).

Os investimentos em pesquisa levaram à "tropicalização" da soja, permitindo, pela primeira vez na história, que o grão fosse plantado com sucesso, em regiões de baixas latitudes, entre o Trópico de Capricórnio e a linha do Equador. Essa conquista dos cientistas brasileiros revolucionou a história mundial da soja e seu impacto começou a ser notado pelo mercado a partir do final da década de 80 e mais notoriamente na década de 90, quando os preços do grão começaram a cair. Atualmente, os líderes mundiais na produção mundial de soja são os Estados Unidos, Brasil, Argentina, China, Índia e Paraguai (EMBRAPA SOJA, 2004).

A cadeia produtiva da soja é de suma importância para a economia brasileira. Em 2005, as exportações do complexo totalizaram US\$ 9,48 bilhões, o equivalente a 20,9% do saldo positivo da balança comercial do País. Além disso, a soja destaca-se como a principal cultura explorada no mercado interno, respondendo por cerca de 45% da produção brasileira de grãos. Em nível mundial, o País já é o segundo maior produtor, atrás apenas dos Estados Unidos, e o maior exportador (Pinazza, 2007).

A décima segunda previsão para produção de soja da safra 2010 (levantamento de agosto) é de 68,69 milhões de toneladas, superando em 20,2%, ou em 11,52 milhões de toneladas, a do ano anterior, que totalizou 57,17 milhões de toneladas. Considerando os principais Estados produtores, as maiores produtividades são observadas nos Estados do Paraná com 3.139 quilos por hectare e de Mato Grosso do Sul com 3.100 quilos. A região Centro-Oeste lidera o ranking da produção com 31,59 milhões de toneladas, correspondendo a 46,0%, com o Estado de Mato Grosso constituindo-se no maior produtor nacional com 18,77 milhões de toneladas. A região Sul vem em seguida com 37,3% (25,64 milhões de toneladas), e o Estado do Paraná, o segundo maior produtor do País, com 14,08 milhões de toneladas. A região Nordeste vem em terceiro lugar. A produção totaliza 5,31 milhões de toneladas e representa 7,7% do total nacional. Em seguida, a região Sudeste participa com produção de 4,46 milhões de toneladas, ou 6,5% da produção do País (CONAB, 2010).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial dessa oleaginosa, embora constasse que a média de produtividade pode ser aumentada. Entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos em soja estão as doenças. Os danos causados pelas doenças à soja vêm sendo relatados desde o início da cultura, no Brasil. No período de 1970 a 1999, cerca de 50 doenças foram identificadas em soja, no Brasil,

resultando em perdas anuais de produção estimadas em cerca de 5,76 milhões de toneladas (US\$1,27 bilhão, a US\$ 220,50/t) (EMBRAPA SOJA, 2000).

Várias moléstias causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus já foram identificadas no Brasil. Doenças fúngicas são as mais numerosas e, conseqüentemente, as que causam maiores danos aos produtores. O número de patógenos continua aumentando com a expansão da soja para novas áreas e como conseqüência da monocultura. 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 por doenças são estimadas entre 15% a 20%, entretanto, algumas doenças podem ocasionar perdas de quase 100% (EMBRAPA SOJA, 2003).

2. PODRIDÃO VERMELHA DA RAIZ DA SOJA

A síndrome da morte súbita (“Sudden Death Syndrome” – SDS) foi observada pela primeira vez em 1971 nos Estados Unidos, no Estado de Arkansas (Rupe, 1989; Rupe & Weidemann, 1986). No Brasil foi observada pela primeira vez na safra 1981/82 em São Gotardo, Minas Gerais e depois no Distrito Federal (Nakajima et al., 1996; Yorinori et al., 1993). Recebeu a denominação de podridão vermelha da raiz (PVR), como ainda é conhecida no país. Em 1996, foram registradas perdas de até 70% ocasionadas pelo patógeno (Yorinori, 1997).

A doença ocorre também na Argentina (Ploper, 1993), no Canadá (Anderson & Tenuta, 1998), no Paraguai (Yorinori, 1999), na Bolívia (Yorinori, 2002) e no Uruguai (Ploper et al., 2003).

2.1. ETIOLOGIA

Inicialmente, o agente causal da síndrome da morte súbita da soja ou podridão vermelha da raiz, foi identificado e caracterizado como *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., classificado como fungo mitospórico (Hifomiceto), antiga divisão Deuteromycetes, ordem Moniliales e família Tuberculariaceae (Roy et al., 1989; Rupe, 1989).

Posteriormente, baseado em características morfológicas, o fungo foi classificado como *Fusarium solani* f. sp. *glycines* (Roy, 1997). Entretanto, em estudos recentes, associando análises moleculares, análises de características morfológicas e de patogenicidade do fungo, foi constatado que havia diferenças suficientes para separá-los em quatro espécies, conforme Aoki et al., 2005: *Fusarium brasiliense*, *Fusarium cuneirostrum*, *Fusarium tucumaniae* e *Fusarium virguliforme*. No Brasil, Arruda et al. (2005) confirmaram a observação de Aoki et al. (2005) de que, no Brasil, a espécie prevalente é *F. tucumaniae*.

A morfologia dos conídios pode ser usada para diferenciar todas as quatro espécies que causam a PVR (Aoki et al., 2005). *Fusarium brasiliense* caracteriza-se por conídios esporodoquiais cilíndricos septados com extremidades arredondadas. Em contrapartida, *F. cuneirostrum* produz conídios esporodoquiais com uma célula apical rostrada e uma célula basal distinta (célula pé). *Fusarium virguliforme* é diferenciado pela produção de conídios com célula apical e basal, simétricas e em formato de vírgula. Já *F. tucumaniae* produz conídios esporodoquiais mais longos e estreitos do que as outras três espécies. Em geral, quando cultivados em SNA (synthetic nutrient agar) podem apresentar conídios com 3 a 4 septos (3 septos: superiores a 50 µm de comprimento e largura de 4,5–5 µm, 4 septos: apresentam normalmente 60 µm de comprimento e 4,5–5 µm de largura) (Aoki et al., 2005).

Essas quatro espécies são de difícil isolamento das raízes da soja, além de crescerem lentamente em meio de cultura, formando inicialmente, micélio de cor branca ou levemente acinzentado em meio BDA. Posteriormente, devido à massa de conídios esporodociais que se formam, as colônias adquirem a coloração azulada ou creme (Almeida et al., 2005; Covert et al., 2007; Nakajima et al., 1996).

De forma geral, o fungo causador da PVR possui como principais características morfológicas conídios curvados, com três a cinco septos, levemente pontiagudos no ápice, que medem 4,0–6,5 μm x 42–74 μm . Conídios do micélio aéreo podem variar de raros a abundantes e os clamidósporos têm formato globoso, podendo ser terminais ou intercalares (Nakajima et al., 1996; Almeida et al., 2005, Aoki et al., 2005).

Reduções severas em produtividade podem ocorrer devido à podridão vermelha da raiz, dependendo do desenvolvimento dos sintomas (Hartman et al., 1999). O efeito da doença na produtividade de grãos depende fundamentalmente do estágio fenológico da planta, do desenvolvimento dos sintomas foliares iniciais e do progresso da doença a partir destes sintomas. Stephens et al. (1993) observaram severas perdas em produtividade, quando os primeiros sintomas foliares foram observados antes do estágio R5 (Fehr et al., 1971). Farias Neto et al. (2006), trabalhando com parcelas inoculadas e não inoculadas com *Fusarium* spp., observaram reduções em produtividade de até 27% em cultivares suscetíveis que apresentaram severos sintomas foliares, correspondendo a cerca de 30% de desfolha em estágio R6. Os sintomas iniciais da doença foram observados nos estádios R4 e R5.

2.2. SINTOMATOLOGIA

O patógeno infecta as raízes reduzindo a massa e a nodulação. O lenho adquire uma coloração castanho-clara, que se estende por vários centímetros acima do solo, mas a medula permanece branca (Roy et al., 1989; Nakajima et al., 1996; Almeida et al., 2005). A raiz principal apresenta uma mancha avermelhada, logo abaixo do nível do solo, que se expande adquirindo coloração negra (Figura 1) (Nakajima et al., 1996; Almeida et al., 2005).

Se uma planta com sintomas foliares avançados da PVR é retirada do solo, seu sistema radicular será menos vigoroso quando comparado com uma planta saudável. As raízes podem também apodrecer. Se as plantas forem coletadas quando o solo estiver úmido, é possível observar pequenas manchas de coloração azul na superfície da raiz principal, perto da linha do solo. Essas manchas são massas de esporos do fungo que causa a PVR. Com a superfície da raiz seca, a cor azul desaparece, mas essas massas de esporos, em conjunto com os outros sintomas mencionados acima, são fortes indicadores de diagnóstico da PRV (Westphal et al., 2008).

Os sintomas nas folhas consistem de manchas cloróticas que aparecem entre as nervuras da folha, normalmente após o estágio R4 (Fehr et al., 1971), podendo ocorrer, em infestações severas, nos estágios vegetativos. Com o desenvolvimento da doença, as lesões tornam-se necróticas ou formam estriações cloróticas (Nakajima et al., 1996). Esse sintoma (Figura 1) é conhecido como folha “carijó” (Almeida et al., 2005), sendo que folhas severamente afetadas caem, mas seus pecíolos permanecem no caule (Nakajima et al., 1996). Esses sintomas são descritos como causados por toxinas produzidas pelo fungo nas raízes e translocadas para as folhas (Li et al., 2000). As

toxinas provocam os sintomas foliares, já que o fungo em si não invade os caules mais do que alguns centímetros acima da linha do solo (Roy et al., 1997).

A PVR da soja normalmente não é detectável na folhagem das plantas até o início da floração. Em circunstâncias raras, plantas jovens, podem apresentar sintomas. É sempre útil comparar as plantas afetadas com plantas saudáveis do mesmo campo, quando se faz a avaliação da doença (Westphal et al., 2008).

Hartman et al. (1999) cita que os sintomas típicos da PVR são similares aos da podridão parda da haste, causada por *Phialophora gregata*, e do cancro da haste, causado por *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*. A podridão parda da haste é diferenciada da PVR por apresentar, nas plantas infectadas, descoloração típica na parte interna da haste, o que não acontece na PVR. Já o cancro da haste pode ser diferenciado da PVR por apresentar cancos nas hastes das plantas infectadas.

Plantas infectadas pelo nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe) também podem apresentar sintomas de folha “carijó”, mas que estão associados à presença dos cistos nas raízes e no solo adjacente. Os sintomas foliares podem ser confundidos também com queimaduras químicas, entretanto é fácil diferenciar devido à ausência de sinais e sintomas nas raízes nesse problema abiótico (Westphal et al., 2008).

2.3. EPIDEMIOLOGIA

O patógeno desenvolve-se em temperaturas entre 25 °C e 28 °C, sendo a temperatura de 25 °C a ideal para o desenvolvimento do fungo em meio de cultura (Hartman et al., 1999). Solos compactados e com água livre favorecem o

desenvolvimento de *Fusarium* spp. causadores da PVR, que se distribui na lavoura em forma de manchas ao acaso (Picinini; Fernandes, 2003). A associação entre alta umidade do solo e ocorrência de PVR é uma observação comum no campo (Roy et al., 1997; Ringler, 1995). Melgar et al. (1994) reportaram que a incidência da doença foi maior em plantas irrigadas do que em plantas não irrigadas. Farias Neto et al. (2006) avaliaram o efeito da umidade na ocorrência e desenvolvimento da PVR, trabalhando com parcelas irrigadas em diferentes fases fenológicas e lâminas d'água. Os autores concluíram que o desenvolvimento dos sintomas da PVR é altamente favorecido pela elevada umidade no solo, especialmente nas fases reprodutivas R4 e R5.

O fungo pode infectar as raízes das plântulas de soja logo após o plantio, penetrando no tecido vascular da planta (Figura 2). Muitas vezes, os primeiros sintomas aparecem depois de chuvas pesadas, durante os estágios reprodutivos, pois a umidade elevada aumenta a severidade da doença (Xing; Westphal, 2006). Os primeiros sintomas visíveis da PVR são amarelecimento e desfolha das folhas superiores (Figura 2). Quando os sintomas aparecem pela primeira vez num campo, eles podem ser limitados a áreas pequenas ou faixas, muitas vezes em zonas úmidas ou compactadas. Durante a segunda e terceira semanas, as áreas afetadas podem aumentar e plantas em outras áreas no campo podem apresentar sintomas (Xing & Westphal, 2006).

A extensão das perdas de produtividade devido à PVR depende da severidade e tempo de expressão da doença em relação ao desenvolvimento das plantas. Caso a doença desenvolva-se no início da temporada, flores e frutos jovens vão abortar, intensificando as perdas. Quando se desenvolve mais tarde, a planta produzirá sementes menores e com menor quantidade por vagem. Devido ao fungo persistir no solo por longos períodos, com o passar do tempo, maiores áreas serão afetadas pela doença (Westphal et al., 2008).

A PVR é mais grave quando há a presença do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines*) e quando a cultivar utilizada é suscetível a ambos os patógenos (Xing & Westphal, 2006). Segundo Roy et al. (1989, propágulos de *Fusarium* spp. já foram isolados de cistos de *H. glycines* tornando evidente, ou sugerindo a associação entre fungo e nematóide. As práticas culturais que mantêm *H. glycines*, em baixos níveis podem reduzir a incidência de PVR, mas é necessária uma investigação mais detalhada para compreender melhor a natureza da interação entre os dois patógenos e suas implicações sobre a epidemiologia da PVR (Westphal et al., 2008).

2.4. CONTROLE

Não existe controle químico adequado para a PVR, sendo que algumas práticas culturais têm sido capazes de reduzir seu impacto (Hartman et al., 1999). Fungicidas aplicados no sulco durante o plantio ou para o tratamento de sementes têm apenas efeitos limitados sobre a redução da doença. Fungicidas aplicados nas folhas não apresentam nenhum efeito, porque mesmo fungicidas sistêmicos normalmente não se movem em direção ao sistema radicular da planta, local da infecção (Westphal et al., 2008).

A semeadura antecipada, o frio e os solos úmidos são fatores que predisõem à infecção. Plantio tardio, além da utilização de cultivares precoces, pode minimizar as perdas (Hershman, 1996). Solos compactados impedem a percolação de água e restringem o crescimento radicular; em conjunto com chuvas excessivas, ocorre a saturação dessas áreas, o que favorece o desenvolvimento da doença. Corrigindo problemas de compactação e da permeabilidade do solo, pode-se reduzir o risco da PVR

(Rupe & Hartman, 1999). A aração, escarificação ou procedimentos similares de manejo do solo melhoram a drenagem, interferem positivamente na posição do resíduo de colheita, bem como na composição microbiana do solo, favorecendo competidores e inimigos naturais do fungo (Aon et al, 2001; Kladivko, 2001). Vick et al. (2003) compararam tratamentos em solo compactado e não compactado e concluíram que a subsolagem diminuía significativamente o efeito da doença na soja.

A rotação de culturas pode reduzir a incidência de PVR (Rupe et al., 1997). Rupe et al. (1997) demonstraram que a rotação de soja com sorgo e trigo reduziu significativamente a população de *Fusarium* spp. causadores da PVR. No entanto, constatou-se que milho-soja em rotação anual, comum no Cinturão do Milho nos Estados Unidos, não reduziu a incidência e a severidade da doença (Xing; Westphal, 2009). Surtos graves de PVR têm ocorrido, mesmo após vários anos de milho contínuo (Xing; Westphal, 2009).

O uso de cultivares resistentes tem sido o método de controle mais eficaz (Farias Neto et al., 2006; Hartman et al., 1999; Leão et al., 1998; Nijti et al., 2001). Em condições de campo, a resistência é descrita como poligênica (Hnetkovsky et al., 1996; Chang et al., 1996) e condicionada por, no mínimo, cinco genes na cultivar Forrest (Meksen et al., 1999; Nijti et al., 1996). A resistência é descrita ainda como parcial, tendo em vista que, sob alta pressão de inóculo, mesmo os genótipos resistentes muitas vezes apresentam algum sintoma típico da podridão vermelha da raiz (Nijti et al., 1996; Igbal et al., 2001; Yorinori, 2000; Mueller et al., 2002; Silva et al., 2002; Gásperi et al., 2003).

Hartman et al. (2000) avaliaram espécies perenes do gênero *Glycine*. Entre elas, vários acessos de *G. tomentella* foram considerados parcialmente resistentes (Hartman et al., 2000). Mueller et al. (2002) testaram 6.037 linhagens de soja visando

identificar fontes potenciais de resistência ao grupo de *Fusarium* spp. causadores da PVR. Algumas apresentaram sintomas foliares menos severos do que o controle, mas não houve diferenças significativas quanto às lesões nas raízes (Mueller et al., 2002). Em um período de três anos, Mueller et al. (2003) avaliaram, em experimentos de casa de vegetação, 2.335 acessos de soja e 90 linhas ancestrais. Trinta e oito acessos e nove linhas ancestrais foram consideradas parcialmente resistentes (Mueller et al., 2003).

Na Argentina, Zamorano et al. (2003) avaliaram 24 cultivares de soja em experimentos de campo para resistência a podridão vermelha da raiz. Todas as cultivares apresentaram sintomas da doença, mas em apenas três eles foram severos (Zamorano et al., 2003). No Brasil, Yorinori (2000) testou 246 cultivares e apenas 22 apresentaram resistência moderada ao patógeno. Silva et al. (2002) avaliaram 86 genótipos de soja, dos quais quatro não apresentaram plantas mortas e cinco tiveram menos de 10% de plântulas afetadas pela doença. Gásperi et al. (2003) realizaram experimentos onde duas formas de inoculação foram testadas, o método “palito de dente” e o método “grão de sorgo”. Dos 30 genótipos testados, apenas um foi considerado moderadamente resistente quando inoculado por ambos os métodos (Gásperi et al., 2003).

Os relatos de Yorinori (2000), Silva et al. (2002) e Gásperi et al. (2003) foram todos baseados em experimentos de casa de vegetação realizados no Sul do Brasil. Farias Neto et al. (2000; 2007) relataram resultados de avaliações de genótipos de soja para resistência a PVR, em experimentos de campo na região dos Cerrados. No ano 2000, dos 164 genótipos testados, apenas sete apresentaram resistência parcial à doença (Farias Neto et al., 2000). Em 2007, foi relatado que, das 93 linhagens avaliadas, entre materiais de ciclo médio e tardio, 13 apresentaram resistência parcial à doença ou foram assintomáticas (Farias Neto et al., 2007).

O progresso da doença e a ocorrência de perdas dependem fundamentalmente das condições ambientais, principalmente umidade e temperatura, o que torna a tarefa de selecionar genótipos resistentes em experimentos de campo, muito mais trabalhosa, pois esses devem ser instalados em vários locais (Njiti et al., 1996; Rupe; Gbur Junior, 1995). Para favorecer o desenvolvimento do patógeno nas áreas experimentais durante o processo de seleção, pode-se utilizar inoculação artificial e irrigação, como relatado por Farias Neto et al. (2006). Métodos de avaliação em casa de vegetação também têm sido testados, tais como os descritos por Stephens et al. (1993), Lim and Jim (1991), Mueller (2001), Njiti et al. (2001) e Klingsfuss et al., (2002). Mais recentemente, Farias Neto (2008) avaliou dois métodos de inoculação em casa de vegetação, de cones e bandeja, correlacionando os resultados com os obtidos em condições de campo. O autor observou uma correlação que variou de 0,51 para o método de bandeja a 0,69 para o método de cones, concluindo que o método de cones pode ser utilizado para avaliar a reação de grande número de genótipos para resistência à PVR. Entretanto, é necessária a avaliação de genótipos nas fases finais de melhoramento em campo, tendo em vista a possibilidade de obtenção de resultados contrastantes entre casa de vegetação e campo.



Figura 1. Sintomas da podridão vermelha da raiz (PVR). Podridão radicular (1), sintomas foliares iniciais (2), que posteriormente se tornem mais severos e chamado de “folha carijó” (3 e 4).

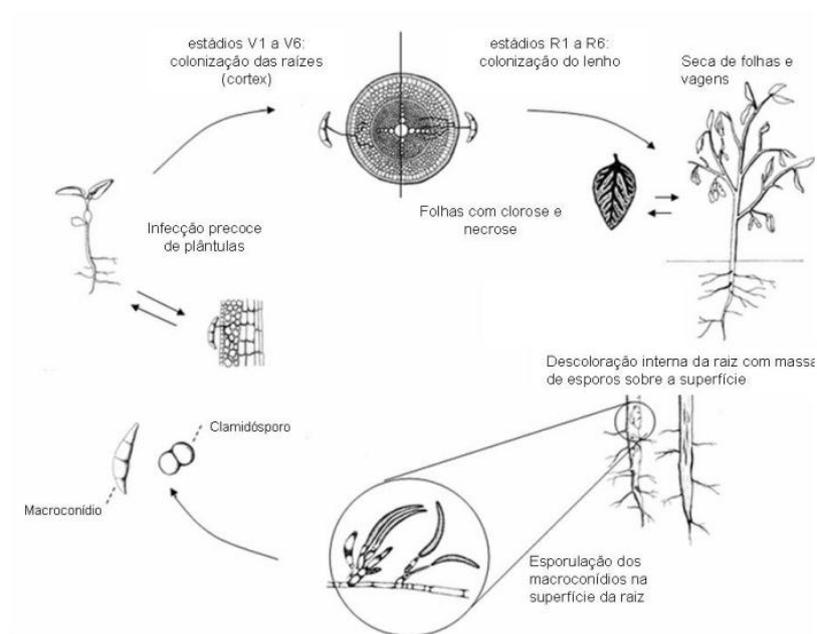


Figura 2. Ciclo da podridão vermelha da raiz (PVR). Ilustração: K. A. Frank

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida AMR, Ferreira LP, Yorinori JT, Silva JFV, Henning AA, Godoy CV, Costamilan LM, Meyer MC (2005) Doenças da soja (*Glycine max*). In: Kimati H, Amorin L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (Ed.). Manual de Fitopatologia. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres,. v. 2, p. 569-588.

Aoki T, O'Donnell K, Homma Y, Lattanzi AR (2005) Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. Mycoscience, v. 46, p. 162-183.

Anderson TR, Tenuta A (1998) First report of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* causing sudden death syndrome of soybean in Canada. Plant Disease, v. 82, p. 449.

Aon MA, Sarena DE, Burgos JL, Cortassa S (2001) (Micro) biological, chemical and physical properties of soils subjected to conventional or no-tillage management, and assessment of their quality status. Soil and Tillage Research, v. 60, p. 173-186.

Arruda GMT, Miller RNG, Ferreira MASV, Café-Filho AC (2005) Morphological and molecular characterization of the sudden death syndrome pathogen of soybean in Brazil. Plant Pathology, v. 54, p. 53-65.

CAB International, (2005). Crop Protection Compendium. Wallingford, UK: CAB International.

Chang SJC, Doubler TW, Kilo V, Suttner R, Klein J, Schmidt ME, Gibson PT, Lightfoot D A (1996) Two additional loci underlying durable field resistance to soybean sudden death syndrome (SDS). Crop Science, v. 36, p. 1684-1688.

CONAB (2010) Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2009/2010 – Décimo Segundo Levantamento – Setembro/2010. Brasília: Conab.

Covert SF, Aoki T, O'Donnell K, Starkey D, Holliday A, Geiser DM, Cheung F, Town C, Strom A, Juba J, Scandiani M, Yang XB (2007) Sexual reproduction in the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium tucumaniae*. Fungal Genetics and Biology, v. 44, p. 799-807.

EMBRAPA SOJA (2000) A cultura da soja no Brasil. Londrina: Embrapa Soja.

EMBRAPA (2003) Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil 2003. Londrina: Embrapa Soja. (Sistema de Produção, 1 Versão eletrônica Jan/2003).

EMBRAPA SOJA (2004) Tecnologias de produção de soja- região central do Brasil – 2005. Londrina: Embrapa Soja; Embrapa Cerrados; Embrapa Agropecuária Oeste. (Sistemas de Produção n.6).

EMBRAPA SOJA (2006) Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil – 2007. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste, 225p. – (Sistemas de Produção, n.11).

Farias Neto AL, Moreira CT, Souza PIM, Oliveira AB (2000) Avaliação de genótipos de soja quanto à resistência à podridão vermelha da raiz (*Fusarium solani* f. sp. *glycines*). In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 22, 2000, Cuiabá. Resumos... Cuiabá: Embrapa Soja, p. 94. (Embrapa Soja Documentos, 144).

Farias Neto AL, Hartman GL, Pedersen WL, Li S, Bollero GA, Diers BW (2006) Irrigation and inoculation treatments that increase the severity of soybean sudden death syndrome in the field. *Crop Science*, v. 46, p. 2547-2554.

Farias Neto AL, Souza PIM, Moreira CT, Dianese AC, Silva NS, Silva SA (2007) Reação de genótipos de soja à síndrome da morte súbita, causada pelo fungo *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 29, 2007, Campo Grande, MS. Resumos. Londrina: Embrapa Soja, p. 128-130 (Embrapa Soja. Documentos, 287). Organizado por Odilon Ferreira Saraiva, Regina Maria Villas Boas de Campos Leite, Simone Grosskopf.

Farias Neto AL, Schimidt M, Hartman GL, Li S, Diers BW (2008) Inoculation methods under greenhouse conditions for evaluating soybean resistance to sudden death syndrome. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, p. 1475-1482.

Fehr WR, Caviness CE (1977) Stages of soybean development. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 11 p. (Special Report, 80).

Gásperi AC, Prestes AM, Costamilan LM (2003) Reação de cultivares de soja à podridão vermelha da raiz causada por *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 28, p. 544-547.

Hartman GL, Gardner ME, Hymowitz T, Naidoo GC (2000) Evaluation of perennial *Glycine* species for resistance to soybean fungal pathogens that cause Sclerotinia stem rot and sudden death syndrome. *Crop Science*, v. 40, n. 2, p. 545-549.

Hartman GL, Sinclair JB, Rupe JC (1999) *Compendium of Soybean Diseases*. St. Paul, MN: APS Press.

Hershman DE (1996) Diseases of the root system: soybean sudden death syndrome. In: Simpósio Sobre o Cerrado: Biodiversidade e Produção Sustentável de Alimentos e Fibras nos Cerrados. 8.: Simpósio Internacional Sobre Savanas Tropicais: Biodiversidade e Produção Sustentável de Alimentos e Fibras nas Savanas Tropicais. 1. Brasília 1996, Anais... p. 97-99.

Hnetkovsky N, Chang SJC, Doubler TW Gibson PT, Lightfoot DA (1996) Genetic mapping of loci underlying field resistance to soybean sudden death syndrome (SDS). *Crop Science*, v. 36, p. 393-400.

Iqbal MJ, Meksem K, Njiti VN, Kassem MA, Lightfoot DA (2001) Microsatellite markers identify three additional quantitative trait loci for resistance to soybean sudden death syndrome (SDS) in Essex x Forrest RILs. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 102, p. 187-192.

Kiihl Ra S (2006) Como recolocar a “locomotiva” nos trilhos? *Visão Agrícola, USP-ESALQ*, ano3, p. 4-7.

Kladivko E (2001) Tillage systems and soil ecology. *Soil and Tillage Research*, v. 61 p. 61-76.

Klingelfuss LH, Yorinori JT, Arias CA, Destro D (2002) Reaction of soybean cultivars to sudden death syndrome and disease scoring methods for screening resistance. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 2, p. 257-264.

Leão RZR, Freitas MA, Café Filho AC (1998) Reaction of soybean cultivars to inoculation with isolates of different *Fusarium* species and formae speciales. *Summa Phytopathologica*, v. 24, n. 3-4, p. 268-271.

Li S, Hartman GL, Lee BS, Widholm JM (2000) Identification of a stress-induced protein in stem exudates of soybean seedlings root infected with *Fusarium solani* f. sp. *glycines* culture filtrates. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 38, p. 803-809.

Lim SM, Jin H (1991) Pathogenic variability in *Fusarium solani* isolated from soybeans with sudden death syndrome symptoms. *Phytopathology*, v. 81, p. 1236.

Mekesem K, Doubler TW, Chanchaoenchai K, Njiti VN, Chang SJC, Rao Arelli AP, Cregan PE, Gray LE, Gibson PT, Lightfoot DA (1999) Clustering among loci underlying soybean resistance to *Fusarium solani*, SDS and SCN in near-isogenic lines. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 99, p. 1131-1142.

Melgar J, Roy KW, Abney TS (1994) Sudden death syndrome of soybean: etiology, symptomatology and effects of irrigation and *Heterodera glycines* on incidence and severity under field conditions. *Canadian Journal of Botany*, v. 72, p. 1647-1653.

Morse WJ (1950) *History of Soybean Production*. Markley, KS Soybeans and soybean products. London: Interscience, pp. 3-59.

Mueller DS, Nelson RL, Hartman GL, Pedersen WL (2003) Response of commercially developed soybean cultivars and the ancestral soybean lines to *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. *Plant Disease*, v. 87, n. 7, p. 827-831.

Mueller DS, Hartman GL, Nelson RL, Pedersen WL (2002) Evaluation of Glycine max germplasm for resistance to *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. *Plant Disease*, v. 86, n. 7, p. 741-746.

Mueller DS (2001) Resistance to *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, the causal organism of sudden death syndrome of soybean. 119 f. (Tese Doutorado) University of Illinois, Urbana-Champaign.

- Nakajima T, Mitsueda T, Charchar MJD (1996) First occurrence of sudden death syndrome of soybean in Brazil. *Japanese Agricultural Research Quarterly*, v. 30, n.1, p. 31-34.
- Njiti VN, Johnson JE, Torto TA, Gray LE, Lightfoot DA (2001) Inoculum rates influence selection for field resistance to soybean sudden death syndrome in the greenhouse. *Crop Science*, v. 41, p. 1-6.
- Njiti VN, Shenaut MA, Suttner RJ, Schmidt ME Gibson PT (1996) Soybean response to sudden death syndrome: inheritance influenced by cyst nematode resistance in Pyramid x Douglas progenies. *Crop Science*, v. 36, n. 5, p. 1165-1170.
- Picinini EC, Fernandes JM (2003) Doenças de soja: diagnose, epidemiologia e controle. 3. ed. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 103 p. (Embrapa Trigo. Documentos, 16).
- Pinazza LA (2007). *Cadeia produtiva da soja (Agronegócios ; v. 2)*. Brasília: MAPA.
- Ploper LD (1993) Síndrome de la muerte súbita: nueva enfermedad de la soja en el noroeste argentino. *Avance Agroindustrial*, v. 13, n. 54, p. 5-9.
- Ploper LD, Yorinori JT, Paiva WM (2003) Importancia de las enfermedades de la soja en el MERCOSUR. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE SOJA, CONGRESO DE AAPRESID, 11, Rosario. Actas... Tomo II. p. 163-174.
- Ringler GA (1995) Reaction of soybean to inoculation with *Fusarium solani*. 125 f. (Dissertação de Mestrado) – University of Illinois, Urbana-Champaign.
- Ritchie SW, Hanway YJJ, Thompson HE, Benson GO (1977) How a soybean plant develops. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 20 p. (Special Report, 53).
- Roy KW, Lawrence GW, Hodges HH, MClean KS, Killebrew JF (1989) Sudden death syndrome of soybean: *Fusarium solani* as incitant of *Heterodera glycines* to disease severity. *Phytopathology*, v. 79, p. 191-197.
- Roy KW (1997) *Fusarium solani* on soybean roots: nomenclature of the causal agent of sudden death syndrome and identity and relevance of *F. solani* form B. *Plant Disease*, v. 81, p. 259-266.
- Rupe JC (1989) Frequency and pathogenicity of *Fusarium solani* recovered from soybeans with sudden death syndrome. *Plant Disease*, v. 73, p. 581-584, 1989.
- Rupe JC, Gbur Junior EE (1995) Effects of plant age, maturity group, and the environment on disease progress of sudden death syndrome of soybean. *Plant Disease*, v. 79, p.139-143.
- Rupe JC, Hartman GL (1989) Sudden death syndrome. In: Hartman GL, Sinclair JB, R Rupe JC (Ed.). 4. ed. *Compendium of Soybean Diseases*. St. Paul, MN: APS Press, p. 37-39.

Rupe JC, Robbins RT, Gbur Junior EE (1997) Effect of crop rotation on soil population densities of *Fusarium solani* and *Heterodera glycines* and on the development of sudden death syndrome of soybean. *Crop Protection*, v. 16, p. 575-580.

Rupe JC, Weidemann GJ (1986) Pathogenicity of a *Fusarium* sp. isolated from soybean plants with Sudden death syndrome. *Phytopathology*, v. 76, p. 1080.

Sediyama T, Pereira MG, Sediyama CS, Gomes JLL (1985) Cultura da soja: I parte. Viçosa: UFV, 96p.

Seixas CDS, Godoy CV, Ferreira LP, Yorinori JT, Henning AA, Almeida AMR (2006) Manejo das doenças da soja nas regiões sul e sudeste. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.31, p.60-61.

Silva JFV, Carneiro GES, Yorinori JT, Almeida AMR, Arias CAA, Kiihl RAS, Almeida LA, Oliveira E, Lima CG, Schober IC, Goulart Filho G, Aliglieri GMG, Gomes JI, Souza NV, Benato LC (2002) Contribuição ao desenvolvimento de linhagens de soja com resistência a patógenos. Londrina: Embrapa Soja, 43 p. (Embrapa Soja. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 1).

Stephens PA, Nickell CD, Lim SM (1993) Sudden death syndrome development in soybean cultivars differing in resistance to *Fusarium solani*. *Crop Science*, v. 33, p. 63-66.

Vick CM, Chong SK, Bond JP, Russin JS (2003) Response of soybean sudden death syndrome to subsoil tillage. *Plant Disease*, v. 87, p. 629-632.

Westphal A, Abney TS, Xing LJ, Shaner GE (2008) Sudden death syndrome of soybean. *The Plant Health Instructor*. St. Paul: Purdue University. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/education/lessonsplantpath/SuddenDeathSyn>>. Acesso em: 24 jun. 2010.

Wilcox JR (2004) World distribution and trade of soybean. In: Boerma HR, Specht J (Ed.). *Soybeans: improvement, production and uses*. 3. ed. Madison: ASA:CSSA:SSSA., (Agron. Monogr., 16) p. 1-14

Xing L, Westphal A (2009) Effects of crop rotation of soybean with corn on severity of sudden death syndrome and population densities of *Heterodera glycines* in naturally infested soil. *Field Crops Research*, v. 112, p.107-117.

Xing LJ, Westphal A (2006) Interaction of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* and *Heterodera glycines* in sudden death syndrome of soybean. *Phytopathology*, v. 96, p. 763-770.

Yorinori JT (2000) Evolução da ocorrência e da severidade da podridão vermelha da raiz da soja (PVR/SDS) e reação das cultivares comerciais à doença. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 22., 2000, Cuiabá. Resumos... Londrina: Embrapa Soja, p. 94. (Embrapa Soja. Documentos, 144).

Yorinori JT, Charchar MJD, Nasser LCB, Henning AA (1993) Doenças de soja e seu controle. In: ARANTES, N. E.; SOUZA, P. I. M. Cultura da Soja nos Cerrados. Piracicaba: Potafos, p. 333-397.

Yorinori JT (1999) Situação atual das enfermidades de soja na Bolívia. In: MERCOSOJA 99, 1999, Rosário. Resumen de trabajos y conferencias presentadas. Rosario: Colegio de Ingenieros Agronomos de Santa Fe: AIANBA, p. 40-43. Paginação irregular.

Yorinori JT (2002) Situação atual das doenças potenciais no Cone Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 2, MERCOSOJA 2002, 2002, Foz do Iguaçu. Perspectivas do agronegócio da soja: anais. Londrina: Embrapa Soja, p. 181-183. (Embrapa Soja. Documentos, 180). Organizado por Odilon Ferreira Saraiva, Clara Beatriz Hoffmann-Campo.

Zamorano MA, Ploper LD, Gonzalez V, Galvez MR, Jaldo HE, Diaz CG, Devani MR (2003) Evaluacion de cultivares comerciales de soja en su respuesta al síndrome de la muerte súbita (*Fusarium solani* f. sp. *glycines*) en Tucuman. Avance Agroindustrial, v. 24, n. 4, p. 8-14.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DE SEVERIDADE DA PODRIDÃO VERMELHA DA RAIZ EM SOJA CAUSADA POR ISOLADOS DE *Fusarium* spp.

RESUMO

Nesse estudo avaliou-se a variabilidade fisiológica de um grupo de isolados de *Fusarium* spp, coletados em diversas regiões de cultivo da soja a partir de lesões típicas da podridão vermelha da raiz. Foram realizados três experimentos. A análise estatística demonstrou diferença significativa entre os isolados e os controles. Em termos de severidade, não houve diferença estatística entre as espécies, apesar de pertencerem a duas espécies distintas, *F. tucumaniae* e *F. brasiliense* e terem sido coletados em diferentes regiões produtoras de soja do país. Nos dois primeiros experimentos com a utilização das cultivares Milena e Tuiuiú, não houve diferença significativa entre as duas cultivares utilizadas. Não foi observado um padrão de susceptibilidade ou resistência dos genótipos. Diferentemente do terceiro experimento, o qual se utilizou as cultivares Milena e Raimunda, onde se verificou que a cultivar Raimunda é mais suscetível em comparação com a Milena. Os dados aqui apresentados apontam que, apesar de haver diferenciação molecular e morfológica entre as espécies de *Fusarium* causadoras da podridão vermelha da raiz em soja, isso não se reflete na interação patógeno-hospedeiro.

INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é a oleaginosa mais cultivada no mundo (Wilcox, 2004). Tem a sua origem nas regiões Norte e Central da China onde é considerada uma das mais antigas culturas de uso humano. Na safra de 1998/99, os Estados Unidos, o Brasil, a Argentina, a China, o Paraguai e a Índia responderam por 93,6% das 158 milhões de toneladas da produção mundial de soja. Os Estados Unidos, o Brasil e a Argentina respondem por 80% da produção e 90% da comercialização mundial de soja (EMBRAPA SOJA, 2000).

A cultura da soja ocupa posição de destaque na economia brasileira, o que justifica a busca de novas informações no sentido de otimizar seu cultivo e reduzir os riscos de prejuízos. Esta cultura sempre teve consigo uma elevada carga de tecnologia para o seu cultivo, sendo impulsionada pela expansão contínua do mercado consumidor interno e externo, que pressionou o crescimento da área cultivada e da produção. Nota-se que os números de produtividade das últimas safras têm-se elevado devido principalmente ao desenvolvimento tecnológico empregado no manejo desta cultura (EMBRAPA SOJA, 2004).

Entre meados dos anos 60 e 80, foi significativo o crescimento da cultura da soja na região do Brasil Central, envolvendo os estados de MS, MT e GO. A abertura dos solos sob vegetação de cerrado proporcionou o crescimento em área e em produtividade de diversas grande culturas, porém foi a soja a cultura que mais cresceu em área de cultivo. Da área total cultivada na safra 2007/2008 (21.016,1 mil ha), a região Norte/Nordeste corresponde a 1967,4 mil ha e a região Centro-Sul a 19048,7 mil ha (CONAB, 2008).

Embora a produção de soja coloque o Brasil como o segundo produtor mundial desta oleaginosa, constata-se que a média de produtividade pode ser aumentada. Para isso, é necessário que haja um maior controle das doenças, parâmetro estabelecido como prioritário nos estudos de demandas de pesquisa (EMBRAPA SOJA, 2000). Entre essas doenças encontra-se a podridão vermelha da raiz (PVR).

A cada ano aumenta a importância econômica da PVR. Na safra de 1998/99, já estava presente em uma área equivalente a cerca de 2 milhões de hectares. As regiões mais afetadas são o sul do Paraná, Santa Catarina, o Planalto Médio do Rio Grande do Sul e as regiões dos Cerrados com altitudes superiores a 800m. As perdas por região ou estado variam de um ano para outro, dependendo da ocorrência de temperaturas elevadas e da estiagem na safra. No momento, não há cifras de perdas, porém, os prejuízos já atingem milhões de dólares. Em casos severos, as perdas, na lavoura, podem atingir 20%-30% (EMBRAPA SOJA, 2000).

A podridão vermelha da raiz (PVR), ou também chamada de síndrome da morte súbita é causada por quatro espécies de fungos: *Fusarium brasiliense*, *Fusarium cuneirostrum*, *Fusarium tucumaniae* e *Fusarium virguliforme* segundo Aoki et al., (2005) e apresenta como sintomas foliares iniciais, manchas cloróticas que aparecem entre as nervuras da folha de uma a duas semanas antes da floração (Nakajima et al., 1996). Quando a planta está entre os estágios de maturação R4 e R5 as manchas cloróticas tornam-se necróticas ou formam estriações cloróticas (Nakajima et al., 1996). Esse sintoma é conhecido como folha “carijó” (Almeida et al., 2005). Folhas, severamente afetadas caem, mas seus pecíolos permanecem no caule (Nakajima et al., 1996). Na raiz, o lenho adquire uma coloração castanho-clara, que se estende por vários centímetros acima do solo, mas a medula permanece branca (Nakajima et al., 1996; Almeida et al., 2005). A raiz principal apresenta uma mancha avermelhada, logo abaixo

do nível do solo, que se expande adquirindo uma coloração negra (Nakajima *et al.*, 1996; Almeida *et al.*, 2005).

Não existe controle químico adequado para a podridão vermelha da raiz e nenhuma prática cultural tem sido capaz de reduzir seu impacto. Plantios tardios e a utilização de cultivares precoces minimizam as perdas (Hershman, 1996). A seleção de cultivares resistentes tem sido o método de controle mais eficaz. Essa dificuldade de controle é em virtude da sua sobrevivência e da multiplicação na maioria dos restos culturais de espécies cultivadas, principalmente poáceas (Roy *et al.*, 1997).

A rotação/sucessão de culturas apresenta pouco ou nenhum efeito sobre o patógeno que é favorecido pela semeadura direta, solo com alta fertilidade e umidade elevada. Na falta de cultivar resistente, a única prática cultural que tem reduzido a severidade da doença é o manejo do solo e a data de semeadura (Wrather *et al.*, 1997). No momento, não há cultivar definida como resistente, porém, diversas cultivares apresentaram menor severidade da doença a campo e em estudos de casa-de-vegetação (Yorinori & Nomura, 1994). Nesse experimento avaliou-se a severidade de um grupo de isolados de *Fusarium* spp. coletados em diversas regiões de cultivo da soja no Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Teste de patogenicidade dos isolados

Nesse experimento avaliou-se a variabilidade fisiológica de um grupo de isolados de *Fusarium* spp, coletados em diversas regiões de cultivo da soja, a partir de lesões típicas da podridão vermelha da raiz (Tabela 1). Os isolados foram caracterizados morfológicamente segundo critérios descritos por Aoki, et al. (2005). Ao todo foram utilizados 60 isolados.

Em tubetes plásticos contendo solo autoclavado, foram semeadas três sementes da cultivar de soja Tuiuiú que é padrão de suscetibilidade para PVR. Após a emergência, fez-se o desbaste deixando apenas duas plântulas por tubete. Os tubetes foram mantidos em casa de vegetação e irrigados diariamente para manter a umidade do solo próximo da capacidade de campo.

O inóculo foi preparado segundo a metodologia descrita por Costa (1997). Placas de Petri de vidro (90 mm de diâmetro), contendo pontas de palito de dente com 15 mm de comprimento em posição vertical, foram esterilizadas. Em seguida, meio BDA + estreptomicina foi vertido nas placas, em quantidade suficiente para que apenas 3 mm da ponta dos palitos permanecessem acima do meio de cultura. As placas foram, posteriormente, repicadas com os 60 isolados, e incubadas em câmara de crescimento durante 13 dias a 25 °C (\pm 2 °C) e fotoperíodo de 12 h, para promover a colonização da ponta dos palitos pelo fungo. No estágio V2 procedeu-se à inoculação de plantas mediante a introdução de uma ponta de palito colonizada no hipocótilo de cada planta, na altura média entre o solo e os cotilédones.

Como o desenvolvimento da infecção, fragmentos de haste da plântula foram coletados e levada para o laboratório onde se procedeu com a descontaminação superficial com álcool 70% e hipoclorito. Posteriormente foi feita a repicagem dessas hastes em meio de cultura (BDA + estreptomicina) para o desenvolvimento do patógeno. Após 10 dias de incubação fez-se nova repicagem dos isolados através de discos do meio de cultura com o micélio. A conservação da coleção foi feita em tubos com meio BDA + estreptomicina.

Preparo do inóculo

Para determinação da variabilidade fisiológica primeiramente foi feita a multiplicação, em placas de Petri com meio de cultura seletivo (BDA + estreptomicina) dos 60 isolados utilizados. A seguir, as placas foram incubadas a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas por sete dias.

O inóculo foi preparado a partir de sementes de sorgo que inicialmente foram imersas em água por 24 horas para que ocorresse a absorção de água. No dia seguinte, o excesso de água foi drenado e 30 g de sementes de sorgo foram colocadas em erlenmeyers de 100 ml. Em seguida, esse substrato foi esterilizado por vinte e cinco minutos, no dia anterior a inoculação. Posteriormente na câmara de fluxo, acrescentou-se a cada erlenmeyer três discos de meio de cultura (BDA) contendo o micélio do patógeno, cultivados anteriormente. Os erlenmeyers foram colocados em uma câmara de crescimento a 25 °C (fotoperíodo de 12 h) por três semanas para o desenvolvimento do fungo.

Após as três semanas foi feita a contagem de esporos em câmara de *Neubauer* para verificar a concentração de conídios presente no inóculo, onde se obteve uma média de $7,38 \times 10^5$ conídios/ml.

Montagem do experimento

O experimento foi desenvolvido em casa de vegetação, onde foram feitas as inoculações e o plantio das sementes de soja em tubetes plásticos. Primeiramente os tubetes foram preenchidos com 100 ml de solo autoclavado, em seguida 3 g de semente de sorgo com inóculo foram depositados sobre o solo e cobertos com 20 ml de solo. Posteriormente três sementes de soja foram semeadas por tubete e cobertas por mais 20 ml de solo (figura 3), para cada isolado utilizou-se 4 tubetes. Foi feito dois tipos de controle, um com presença de sementes de sorgo esterilizadas sem a presença do patógeno e outro apenas com o solo autoclavado. Após a germinação das sementes realizou-se o desbaste deixando apenas duas plantas por tubete.

Três cultivares de soja adaptadas às condições do Cerrado foram utilizadas no experimento: Milena (moderadamente resistência), Tuiuiu (suscetível) e Raimunda (suscetível). No entanto, esse padrão de resistência foi relatado por Farias Neto, et al. (2008), a partir de experimentos de campo onde a avaliação de severidade da PVR foi baseada apenas em sintomas foliares. Ao todo foram realizados três experimentos: dois com as cultivares Milena e Tuiuiu, e um com Milena e Raimunda.

O delineamento utilizado foi o de blocos inteiramente casualizados com quatro repetições por isolado por cultivar, cada repetição com um tubete contendo duas plantas.

Avaliações

As avaliações da severidade dos isolados foram feitas 30 dias após o plantio através da pesagem da massa seca das raízes. Onde se retirou todo o solo das raízes através de sua lavagem e cortou-se a parte aérea das plântulas. As raízes coletadas foram identificadas e colocadas em sacos de papel e incubadas em uma estufa por nove dias para secagem e posteriormente foi feita a pesagem.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e os valores médios de massa seca de raiz por isolado, foram comparados através do teste de Tukey (P=5%). A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o programa SigmaStat 2.0 da Jandel Corporation (1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todos os três experimentos houve uma diferença significativa entre os 60 isolados e os controles, onde observamos uma grande deterioração do sistema radicular das plântulas (Figura 4), onde a média de porcentagem de perdas de massa seca de raiz ficou em 67,5%. Entretanto não ocorreu uma diferenciação significativa entre as cultivares utilizadas, em termos de severidade da doença. Devido a esse motivo todos os experimentos foram avaliados juntos, considerando apenas como cultivares moderadamente resistentes e suscetíveis.

Dentre os 60 isolados avaliados, os que causaram a PVR com maior severidade foram os isolados 47, 23, 37, 53, 40, 11, 57 e 21, com perdas variando de 86,9 a 80,7%. Já os isolados que provocaram uma menor deterioração do sistema radicular das

plântulas foram os isolados 58, 27, 3 e 46 com porcentagens de perdas de massa seca de raiz entre 50,7 a 46,4% (Tabela 1).

Através da análise de variância e os valores médios da porcentagem de perda de massa seca da raiz comparados pelo teste de Tukey (P=5%), ficou comprovado que não houve diferença estatística dentro do grupo de isolados, apesar de pertencerem a duas espécies distintas que são prevalentes no Brasil, *Fusarium tucumaniae* e *F. brasiliense* (Aoki, 2005). Não se notou diferenças significativas de severidade da PVR em relação às diferentes regiões geográficas onde foram feitas as coletas, resultado semelhante aos obtidos por Li, et al (2009).

Os resultados obtidos foram diferentes dos experimentos realizados por Farias Neto, et al. (2008), onde não foi observado um padrão de suscetibilidade ou resistência dos genótipos utilizados. Os sintomas foliares foram raros nos experimentos em casa de vegetação, provavelmente devido ao método de inoculação, que não permite escape, ocasionando uma maior e mais rápida deterioração do sistema radicular das plântulas. Além disso, em campo os sintomas foliares aparecem tardiamente, quando a planta atinge os estádios R4/R5. Assim, não haveria tempo hábil para que as lesões se desenvolvessem no experimento em casa de vegetação. No entanto, era esperado que a cultivar Milena apresentasse um desempenho superior à Tuiuiú. Logo, os dados sugerem que não há correlação entre resistência “de raiz” e a baixa severidade de sintomas foliares. Alguns autores já afirmaram que a severidade dos sintomas foliares é um fator pouco eficiente para a avaliação a resistência da soja a PVR ocorrendo com frequência a ausência de sintomas foliares em plantas infectadas (Njiti et al., 1997).

Outra hipótese levantada por Li, et al (2009) é que alguns isolados podem ser bons colonizadores da raiz, mas entretanto podem ou não ser bons produtores de toxinas que causam os sintomas foliares. Partindo deste pressuposto fica evidente que apenas

avaliações dos sintomas foliares não são suficientes para estudos sobre resistência de cultivares a esses patógenos.

Os dados aqui apresentados apontam que, apesar de haver diferenciação molecular e morfológica entre as espécies de *Fusarium* causadoras da podridão vermelha da raiz em soja, isso não se reflete na interação patógeno-hospedeiro. Essa uniformidade é um fator positivo para os programas de melhoramento, pois uma cultivar desenvolvida para a resistência à fusariose da soja deverá ter desempenho similar, independente da região de plantio.

Tabela 1. Comparação dos valores médios percentuais da perda de massa seca da raiz de plântulas de soja inoculadas com isolados de *Fusarium* spp. causadores da podridão vermelha da raiz (PVR), em casa de vegetação (Embrapa Cerrados – Planaltina, DF).

IS ¹	PMS ² %	Local	E*	IS	PMS %	Local	E
47	86,90 g	Passo Fundo/RS	<i>Fb</i> ³	-	-	<i>Continuação</i>	-
23	83,19 fg	Rio Verde/GO	<i>Ft</i> ⁴	43	66,54 b-g	São Gotardo/MG	<i>Fb</i>
37	82,97 fg	Passo Fundo/RS	<i>Ft</i>	19	66,54 b-g	São João D'Aliança/GO	<i>Ft</i>
53	82,79 fg	Luziânia/GO	<i>Fb</i>	17	66,14 b-g	Luziânia/GO	<i>Ft</i>
40	82,59 fg	Brasília/DF SDS 1	<i>Fb</i>	33	65,82 b-g	Tupirama/TO	<i>F</i> ⁵
11	82,05 fg	Ituverava/SP	<i>Fb</i>	38	65,22 b-g	Passo Fundo/RS	<i>Ft</i>
57	80,82 e-g	Cristalina/GO	<i>Fb</i>	9	65,17 b-g	Floresta/PR	<i>Fb</i>
21	80,69 d-g	Passo Fundo/RS	<i>Ft</i>	35	64,33 b-g	Formosa/GO	<i>Fb</i>
60	77,54 c-g	Cristalina/GO	<i>Fb</i>	15	64,20 b-g	Luziânia/GO	<i>Ft</i>
13	76,70 c-g	Cristalina/GO	<i>Ft</i>	30	64,18 b-g	Silvânia/GO	<i>Ft</i>
59	76,37 b-g	Cristalina/GO	<i>Fb</i>	34	63,57 b-g	Pedro Afonso/TO	<i>Fb</i>
7	76,10 b-g	Campo Mourão/PR	<i>Fb</i>	32	63,53 b-g	Silvânia/GO	<i>Ft</i>
20	74,62 b-g	Rio Verde/GO	<i>Ft</i>	29	63,44 b-g	Silvânia/GO	<i>Ft</i>
31	74,42 b-g	Silvânia/GO	<i>Ft</i>	56	62,12 b-g	Londrina/PR	<i>Fb</i>
4	73,58 b-g	Campo Mourão/PR	<i>Fb</i>	22	61,77 b-g	Rio Verde/GO	<i>Ft</i>
50	72,69 b-g	Formosa/GO	<i>Fb</i>	14	60,24 b-g	Cristalina/GO	<i>Fb</i>
2	71,82 b-g	Passo Fundo/RS	<i>Ft</i>	42	60,19 b-g	Brasília/DF SDS 5	<i>Fb</i>
52	71,72 b-g	Ponta Grossa/PR	<i>Fb</i>	36	59,00 b-g	Formosa/GO	<i>Fb</i>
48	71,62 b-g	Chapadão do Sul/MS	<i>Fb</i>	6	58,54 b-g	Ponte Nova/MG	<i>Ft</i>
8	70,54 b-g	Brasília/DF SDS-2	<i>Fb</i>	51	57,98 b-g	Ponta Grossa/PR	<i>Fb</i>
44	70,33 b-g	Planaltina/DF	<i>Ft</i>	41	57,39 b-g	Brasília/DF SDS 3	<i>Fb</i>
5	70,22 b-g	Campo Mourão/PR	<i>Fb</i>	10	56,28 b-g	São Joaquim da Barra/SP	<i>Fb</i>
25	69,93 b-g	São João D'Aliança/GO	<i>Fb</i>	26	56,13 b-g	PAD/DF	<i>Fb</i>
49	69,31 b-g	Ponta Grossa/PR	<i>Fb</i>	18	54,46 b-g	Luziânia/GO	<i>Ft</i>
16	69,27 b-g	Luziânia/GO	<i>Ft</i>	28	53,08 b-f	Rio Verde/GO	<i>Ft</i>
55	69,25 b-g	Ponta Grossa/PR	<i>Fb</i>	58	50,74 b-e	Chapadão do Sul/MS	<i>Fb</i>
45	69,18 b-g	Planaltina/DF	<i>Ft</i>	27	50,72 b-d	Luziânia/GO	<i>Fb</i>
1	68,78 b-g	Chapadão do Sul/MS	<i>Fb</i>	3	48,76 bc	São Gotardo/MG	<i>Fb</i>
12	68,46 b-g	Cristalina/GO	<i>Ft</i>	46	46,42 b	Passo Fundo/RS	<i>F</i>
39	67,40 b-g	Planaltina/DF	<i>Fb</i>	C1	00,00 a		
24	67,08 b-g	Planaltina/DF	<i>Ft</i>				
54	66,60 b-g	Passo Fundo/RS	<i>Fb</i>	DMS**	30,08**		

*Classificação taxonômica das espécies segundo critérios morfológicos descritos por Aoki, et al. (2005).

**Diferença mínima significativa, segundo teste de Tukey (P=5%).

¹ Isolados.

² Porcentagens de massa seca perdida.

³ *Fusarium brasiliense*

⁴ *Fusarium tucumaniae*

⁵ *Fusarium* sp.

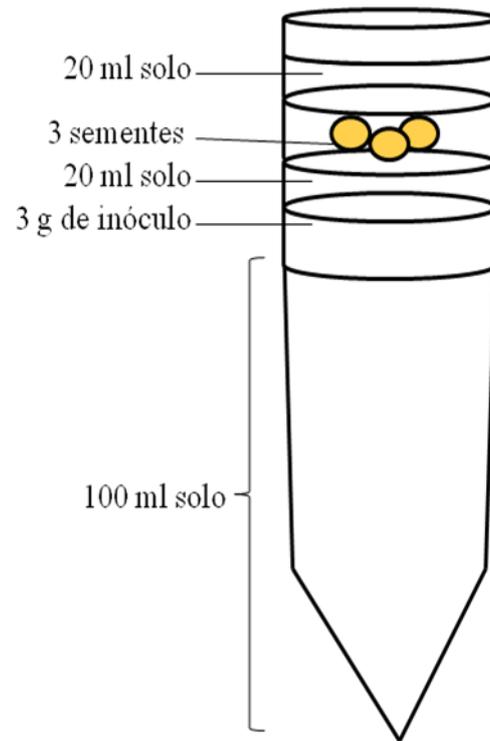


Figura 3. Esquema do processo de inoculação para a avaliação da severidade de isolados de *Fusarium* spp. causadores da PVR.



Figura 4. Sistema radicular das plântulas de soja, mostrando a diferença entre as plantas inoculadas (esquerda) e o controle (direita).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida AMR, Ferreira LP, Yorinori JT, Silva JFV, Henning AA, Godoy CV, Costamilan LM, Meyer MC (2005) Doenças da soja (*Glycine max*). In: Kimati H, Amorin L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (Ed.). Manual de fitopatologia. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres., v. 2, p. 569-588.

Aoki T, O'Donnell K, Homma Y, Lattanzi AR (2005) Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. Mycoscience, v. 46, p. 162-183.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: grãos: sexto levantamento, março 2008/ Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília: Conab.

CONAB (2010) Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2009/2010 – Décimo Segundo Levantamento – Setembro/2010. Brasília: Conab.

Costa CL (1997) Variabilidade morfológica e patológica de isolados de *Fusarium solani* associados à podridão vermelha da raiz (PVR) da soja (Tese de Mestrado). Londrina, PR. Universidade Estadual de Londrina.

EMBRAPA SOJA (2000) A cultura da soja no Brasil. Londrina: Embrapa Soja.

EMBRAPA SOJA (2004) Tecnologias de produção de soja- região central do Brasil – 2005. Londrina: Embrapa Soja; Embrapa Cerrados; Embrapa Agropecuária Oeste. (Sistemas de Produção n.6).

Farias Neto AL, Schimidt M, Hartman GL, Li S, Diers BW (2008) Inoculation methods under greenhouse conditions for evaluating soybean resistance to sudden death syndrome. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 43, p. 1475-1482.

Hershman DE (1996) Disease of the root system: soybean sudden death syndrome. In: Simpósio Sobre o Cerrado: Biodiversidade e Produção Sustentável de Alimentos e Fibras nos Cerrados. 8.: Simpósio Internacional Sobre Savanas Tropicais: Biodiversidade e Produção Sustentável de Alimentos e Fibras nas Savanas Tropicais. 1. Brasília 1996, Anais... p. 97-99.

Li S, Hartman GL, Chen Y (2009) Evaluation of aggressiveness of *Fusarium virguliforme* isolates that cause soybean sudden death syndrome. Journal of Plant Pathology, v. 91, n. 1, p. 77-86.

Nakajima T, Mitsueda T, Charchar MJD (1996) First occurrence of sudden death syndrome of soybean in Brazil. Japanese Agricultural Research Quarterly, v. 30, n.1, p. 31-34.

Njiti VN, Suttner RJ, Grays LE, Gibson PT, Lightfoot DA (1997) Rate reducing resistance to *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* under lies resistance to soybean sudden death syndrome. Crop Science, Madison, v. 37, n.1, p. 132-138.

Roy KW (1997) *Fusarium solani* on soybean roots: nomenclature of the causal agent of sudden death syndrome and identity and relevance of *F. solani* form B. Plant Disease, v. 81, p. 259-266.

Wilcox JR (2004) World distribution and trade of soybean. In: Boerma HR, Specht J (Ed.). Soybeans: improvement, production and uses. 3. ed. Madison: ASA:CSSA:SSSA., (Agron. Monogr., 16) p. 1-14

Wrather JA, Anderson TR, Arsyad DM, Gai J, Ploper LD, Porta-Puglia A, Ram HH, Yorinori JT (1997) Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1994. Plant Disease , v.81, p.107-110,.

Yorinori JT, Nomura SL (1994) Cultivares de soja resistentes à podridão vermelha da raiz causada por *Fusarium solani*. Fitopatologia Brasileira, v.19, p.339. Suplemento. /Resumo/

CAPÍTULO 3

DETERMINAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Fusarium* spp. CAUSADORES DA PODRIDÃO VERMELHA DA RAIZ EM SOJA

RESUMO

A podridão vermelha das raízes da soja (PVR), ou síndrome da morte súbita causada pelos fungos *Fusarium tucumaniae*, *F. brasiliense*, *F. cuneirostrum* e *F. virguliforme* tem sido observada nas principais regiões produtoras de soja do país. Objetivou-se nesse trabalho, averiguar a diversidade genética de isolados de *Fusarium* spp. causadores da PVR, coletados em regiões produtoras de soja no Brasil. Ao todo foram utilizados 56 isolados comparados através de RAPD com o auxílio de 12 primers de sequência arbitrária. Através da análise de agrupamento dos produtos de amplificação, foram calculadas as distâncias genéticas entre todos os isolados e ficou clara a tendência de separação em três grupos distintos com 49% de similaridade. No maior dos clados, observou-se um agrupamento de isolados de *F. brasiliense*, no segundo grupo ficaram concentrados os isolados de *F. tucumaniae*. O terceiro clado foi composto por apenas dois isolados, provavelmente pertencentes a uma terceira espécie de *Fusarium* do complexo da PVR. Dentre os isolados analisados, 59,3% são da espécie *F. brasiliense* e 40,7 % são de *F. tucumaniae*. Os resultados obtidos poderão auxiliar em estratégias de controle desta doença e servir como base para estudos sobre melhoramento genético da soja visando à resistência a esse patógeno. Isolados das duas espécies foram encontrados nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, sendo que nesta última foi coletada a maioria dos isolados, 51,4% era de *F. brasiliense* e 48,6% de *F. tucumaniae*.

INTRODUÇÃO

A soja foi introduzida no Brasil por Gustavo Dutra, na Bahia em 1882, e foi cultivada pela primeira vez em São Paulo por Daffert, em 1892, no Instituto Agrônômico de Campinas (IAC). Sendo o país pioneiro no cultivo de soja em regiões com latitude menores que 20° (Roessing & Guedes, 1993; Sedyama et al., 1985). Atualmente essa cultura é a principal commodity de exportação no país e a sua produção cresce a cada ano.

A cadeia produtiva da soja é de suma importância para a economia brasileira. Em 2005, as exportações do complexo totalizaram US\$ 9,48 bilhões, o equivalente a 20,9% do saldo positivo da balança comercial do País. Além disso, a soja destaca-se como a principal cultura explorada no mercado interno, respondendo por cerca de 45% da produção brasileira de grãos. Em nível mundial, o País já é o segundo maior produtor, atrás apenas dos Estados Unidos, e o maior exportador (Pinazza, 2007).

As doenças estão entre os principais fatores limitantes à obtenção de elevados rendimentos para essa cultura, sendo a podridão vermelha das raízes da soja (PVR) ou síndrome da morte súbita (“sudden death syndrome”), um dos problemas fitossanitários que vem se destacando na atualidade. No Brasil, a doença foi observada pela primeira vez, na região de São Gotardo – MG na safra de 1981/82 e somente a partir dos anos 90 é que passou a causar prejuízos maiores. Nas safras de 1992/93 e 93/94, a PVR foi registrada nos estados de MS, GO, RS, e SC, tendo aumentado a importância de forma generalizada nos Cerrados (Yorinori et al., 1993; Yorinori, 1994).

Pela provável natureza poligênica da resistência à PVR e pela grande influência do ambiente na intensidade de manifestação dos sintomas, aliados ao fato da inexistência de um método de controle químico ou cultural eficiente, a PVR tornou-se,

sem dúvida, uma grande preocupação para os sojicultores, técnicos e pesquisadores nas regiões onde sua ocorrência já foi constatada (Fronza, 2003).

Inicialmente, o agente causal da síndrome da morte súbita (SDS) ou podridão vermelha da raiz (PVR), foi identificado e caracterizado como *Fusarium solani* (Mart.) Sacc (Roy et al., 1989; Rupe, 1989). Posteriormente, baseado em diferenças de patogenicidade, o fungo foi classificado como *Fusarium solani* f. sp. *glycines* (Roy, 1997). Entretanto, em estudos recentes, associando análises moleculares, análises de características morfológicas e de patogenicidade do fungo, foi constatado que havia diferenças suficientes para separar em quatro espécies: *Fusarium brasiliense*, *Fusarium cuneirostrum*, *Fusarium tucumaniae* e *Fusarium virguliforme* (Aoki et al., 2005). Arruda et al. (2005) confirmaram a observação de Aoki et al. (2005) de que a espécie prevalente no Brasil é *F. tucumaniae*. No entanto um estudo mais aprofundado, com um maior número de isolados se faz necessário.

A técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) que é baseada no princípio da PCR (Polymerase Chain Reaction) é bastante eficiente para este tipo de estudo segundo Williams et al. (1990) e Welsh & McClelland (1990). Esta técnica envolve a amplificação de regiões anônimas dispersas pelo genoma, onde a estratégia é a utilização de iniciadores ou primers curtos e aleatórios que se anelam a diferentes locais no DNA genômico (Fungaro, 2000).

Os marcadores de RAPD permitem gerar uma grande quantidade de informações sobre a diversidade genética. Em geral, os dados são obtidos na forma de matriz composta por certo número de genótipos que podem ser variedades, isolados ou clones, genotipados para dezenas ou centenas de marcadores RAPD, obtidos com um ou mais primers. O número de marcadores permite uma análise extensiva dos genomas de

interesse diretamente da molécula de DNA, conseqüentemente sem influência do ambiente (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Neste contexto, diversos trabalhos têm sido realizados com RAPD no gênero *Fusarium* envolvendo análise da variabilidade, mapeamento genético, diferenciação de isolados, estudo de populações, dentre outros (Bentley et al., 1995). Assim o objetivo deste trabalho foi analisar a variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp causadores da PVR, em diversas regiões do país através da técnica de RAPD.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material biológico

Foram utilizados 56 isolados, oriundos de diversas regiões produtoras de soja do país a partir de lesões típicas da podridão vermelha da raiz (Tabela 2). Os isolados puros foram repicados em placas de Petri, contendo o meio de cultura BDA (batata dextrose ágar) e incubados a 25 °C a um fotoperíodo de 12 hora por sete dias para seu desenvolvimento. Como padrão de comparação foi utilizado um isolado de *Fusarium solani* cedido pela Dra. Marta Aguiar da Embrapa Cenargen.

Extração de DNA

Utilizou-se o protocolo de extração de DNA do fungo pelo método CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide) (Zolan e Pukilla, 1986) com modificações. Primeiramente preparou-se o tampão de extração CTAB (Tabela 2), logo após coletou-se aproximadamente 60 mg de micélio, o qual foi colocado em tubos Eppendorfs de 2,0 ml autoclavados. Em seguida adicionou-se 450 µl de tampão CTAB e se colocou em banho a 65° C por 30 minutos. Logo após acrescentou-se 400 µl de clorofórmio com álcool isoamílico (24:1), agitou-se por 10 minutos até que se formou uma emulsão. Posteriormente todos os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos.

Ao finalizar a centrifugação foram coletados 200 µl do sobrenadante para novos tubos de Eppendorf autoclavados. Completou-se com 200 µl de isopropanol gelado e inverteu-se cada tubo várias vezes, por aproximadamente 2 minutos. Em seguida foram colocados em geladeira por 30 minutos a 5° C, logo depois foram centrifugados a 7000 rpm por 10 minutos.

Seguindo o protocolo, após acabar a centrifugação o sobrenadante foi descartado e os pellets foram lavados com 200 µl de álcool 70% e centrifugados por 5 minutos a 7000 rpm. Deixou-se secar completamente e foram ressuspensos em 100 µl de água milli-Q contendo RNase na concentração final de 40 µg/ml. Logo após os tubos foram colocados em banho-maria a 37° C por 30 minutos para dissolver o pellet. Ao final realizou-se a quantificação do DNA através de leitura em espectrofotômetro (UV a 260), e posteriormente todos os tubos foram armazenados em freezer.

Escolha dos primers

Foram utilizados primers universais da invitrogen (OPD 7, OPD 4, OPA 11, OPB 9, OPB 7, OPB 17, OPF 14, OPE 20, OPE 11, OPD 16, OPD 8, OPF12, OPH 16, OPG 19, OPG 17, OPG 8, OPG 5, OPF 17, OPB 1, OPB 6, OPA 20, OPA 3, OPR 8, OPR 6). Inicialmente fez-se a diluição dos primers em água Milli Q, posteriormente foi feito um teste com quatro isolados, onde foram escolhidos os primers que apresentaram os melhores padrões de bandas. Os primers com melhores resultados obtidos foram: OPD 7, OPD 4, OPD 9, OPB 7, OPB 17, OPF 14, OPE 20, OPE 11, OPD 8, OPF12, OPG 17, OPG 5, OPB 6, OPA 3, OPR 8.

Amplificação do DNA – RAPD

Para a amplificação das amostras utilizou-se uma mistura conforme descrito na Tabela 3. Após o preparo do mix, pipetou-se 13 µl da solução para cada poço da placa e em seguida 3 µl do DNA na concentração de 5 ng/µl, adicionando logo após o óleo

mineral para evitar a evaporação e levou ao termociclador (modelo PTC-100 da MJ Research, Inc) como o seguinte programa: no primeiro passo com 94° C por dois minutos, no segundo foram 40 ciclos de 94° C a 15 segundos, 35° C a 30 segundos e 72° C por um minuto e meio. No terceiro passo foram 72° C por 6 minutos.

Após o processo de amplificação, as reações de PCR foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1x. Para o preparo do gel de corrida, utilizou-se 5g de agarose dissolvida em 500 ml de solução tampão. O gel foi corado com brometo de etídio, para visualização dos fragmentos em transiluminador de UV e em seguida fotodocumentado.

Análise computacional dos dados

Para a análise do produto do RAPD foi utilizado o programa BioNumerics. Os dados foram introduzidos no software, que possui a função de principal de analisar um grande número de conjuntos de informações, o qual faz uma seleção através de diferenças e similaridades, sintetizando e agrupando os resultados em respostas conclusivas.

Os dados foram inseridos como variáveis binárias, ou seja, o número 1 significando presença de banda e o número 0, a ausência. Desta maneira, este programa construiu uma matriz, utilizando-se do coeficiente de similaridade Jaccard, que compara o número de presenças de bandas comuns e o total de bandas envolvidas, excluindo o número de ausências conjuntas ($a/a+b+c$, sendo que a significa a quantidade de marcas positivas concordantes e b e c significa o número de marcas discordantes). Estes dados da matriz de similaridade foram então utilizados pelo programa para a construção de

dendrogramas pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average) o qual estabeleceu relações genéticas entre os diferentes isolados.

A matriz de distâncias genéticas foi utilizada para realizar análises de dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais usando o método das coordenadas principais, com auxílio do Programa SAS e Statistica (Statsoft Inc., 1999). O ajuste entre a matrizes de distância e o dendrograma foi estimado pelo coeficiente de correlação cofenética (r), conforme Sokal & Rohlf (1962), por meio do programa computacional NTSYS pc 2.1 (Rohlf, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de polimorfismo dos isolados foi realizada utilizando 12 oligonucleotídeos de seqüência arbitrária. Os 12 primers selecionados (OPD 7, OPB 9, OPE 20, OPE 11, OPD 8, OPF12, OPG 17, OPG 5, OPB 6, OPA 3, OPR 8) foram analisados e geraram um padrão de bandas bem distinto que proporcionou a observação de um total de 1423 fragmentos polimórficos. Os amplicons obtidos com os 12 primers analisados geraram fragmentos que variaram de 2,5 a 0,1 kb.

A utilização da técnica de RAPD possibilitou a diferenciação de isolados em espécies causadoras da PVR. A análise do padrão de bandas gerado por cada primer utilizado permitiu a construção de uma matriz de similaridade segundo o coeficiente de Jaccard. O método de UPGMA construiu um dendrograma (Figura 5), onde foram observados diferentes níveis de similaridade (90,5 % a 49,0%).

Através dos produtos de amplificação gerados, foram calculadas as distâncias genéticas, analisadas ao pares, entre todos os isolados e ficou bem clara a tendência de separação entre três clados distintos de isolados de *Fusarium* spp. (Figura 5). A partir do dendrograma gerado foi possível a observação de uma grande variabilidade genética entre os isolados, onde ocorreu a separação em grupamentos distintos com 49% de similaridade. No primeiro clado, observou-se um agrupamento de isolados de *Fusarium brasiliense* (de acordo com critérios morfológicos de Aoki, 2005), no segundo grupo ficaram concentrados os isolados de *F. tucumaniae* segundo critérios morfológicos de Aoki (2005). O menor dos grupos formado foi composto de apenas dois isolados (46 e 33), pertencentes provavelmente a uma terceira espécie do complexo da podridão vermelha da raiz de soja.

No trabalho de O'Donnel e Gray (1995), através do sequenciamento de uma região de aproximadamente 600 bp amplificada com os *primer* ITS5 e NL4, foi constatado pela primeira vez que isolados de *Fusarium solani* f. sp. *glycines* formaram um grupo geneticamente distinto de *F. solani* não causadores da podridão vermelha da raiz em soja. Li et al. (2000) e Achenbach et al. (1996) já utilizaram a análise de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), onde apontaram que os isolados causadores da podridão vermelha da raiz em soja, seriam um grupo distinto de *F. solani* f. sp. *phaseoli* e que até poderiam formar uma outra *forma specialis*. Arruda et al. (2005) também confirmaram o agrupamento de isolados causadores da PVR separado dos isolados de *F. solani* não relacionados à doença.

Dentre os isolados analisados, 59,3% são da espécie *F. brasiliense* e 40,7 % são de *F. tucumaniae*, conforme avaliações morfológicas. Esse resultado mostrou-se diferente dos obtidos por Arruda et al. (2005) e por Aoki et al. (2005), que afirmaram ser *F. tucumaniae* a espécie prevalente no Brasil. No primeiro clado observamos que ao redor de 82% dos isolados eram de *F. brasiliense*, já no segundo clado cerca de 80% de *F. tucumaniae*. Não houve a associação dos isolados em relação à região geográfica onde foram coletados, ou seja, em uma mesma região pode ser encontrado mais de uma espécie do patógeno.

Apenas características culturais e morfológicas não são suficientes para identificação de espécies de *Fusarium* causadores da PVR, devido principalmente a grande variabilidade genética existente entre os isolados. A utilização de estudos moleculares é uma alternativa bastante eficiente, fornecendo dados mais precisos para a caracterização de isolados, além de estabelecer um padrão de relações filogenéticas. Pode-se considerar que as similaridades e diferenças nos padrões de bandas obtidos

através da técnica de RAPD, é uma ferramenta molecular útil em estudos de variabilidade genética de espécies de *Fusarium* causadoras da PVR.

Levando em consideração a importância da soja na economia nacional bem com as perdas provocadas pela podridão vermelha da raiz (PVR), os resultados encontrados no presente trabalho, são informações relevantes que poderão auxiliar no entendimento da estrutura populacional e da variabilidade genética presente no complexo da PVR em diversas regiões produtoras de soja do Brasil. Esse estudo poderá possibilitar em uma melhor utilização prática para estratégias de controle desta doença. Além de servir como base para posteriores estudos sobre melhoramento genético visando à resistência de plantas a esse patógeno.

Tabela 2. Relação de isolados da coleção de *Fusarium* spp. associados à raízes de soja, utilizados no experimento, com seus números de identificação e respectivos locais de coleta e espécies.

IS ¹	Local	Espécie*	IS	Local	Espécie
1	Chapadão do Sul - MS	<i>F. brasiliense</i>		<i>Continuação</i>	
2	Passo Fundo – RS	<i>F. tucumaniae</i>	31	Silvânia – GO	<i>F. tucumaniae</i>
3	São Gotardo – MG	<i>F. brasiliense</i>	32	Silvânia – GO	<i>F. tucumaniae</i>
4	Campo Mourão – PR	<i>F. brasiliense</i>	33	Tupirama – TO	<i>Fusarium</i> sp
5	Campo Mourão – PR	<i>F. brasiliense</i>	34	Pedro Afonso – TO	<i>F. brasiliense</i>
6	Ponte Nova – MG	<i>F. tucumaniae</i>	35	Formosa – GO	<i>F. brasiliense</i>
7	Campo Mourão – PR	<i>F. brasiliense</i>	36	Formosa – GO	<i>F. brasiliense</i>
8	Brasília - DF SDS-2*	<i>F. brasiliense</i>	37	Passo Fundo – RS	<i>F. tucumaniae</i>
9	Floresta- PR	<i>F. brasiliense</i>	38	Passo Fundo – RS	<i>F. tucumaniae</i>
10	São Joaquim da Barra - SP	<i>F. brasiliense</i>	39	Planaltina – DF	<i>F. brasiliense</i>
11	Ituverava – SP	<i>F. brasiliense</i>	40	SDS 1*	<i>F. brasiliense</i>
12	Cristalina – GO	<i>F. tucumaniae</i>	41	SDS 3*	<i>F. brasiliense</i>
13	Cristalina – GO	<i>F. tucumaniae</i>	42	SDS 5*	<i>F. brasiliense</i>
14	Cristalina – GO	<i>F. brasiliense</i>	43	São Gotardo – MG	<i>F. brasiliense</i>
15	Luziânia – GO	<i>F. tucumaniae</i>	44	Planaltina – DF	<i>F. tucumaniae</i>
16	Luziânia – GO	<i>F. tucumaniae</i>	45	Planaltina – DF	<i>F. tucumaniae</i>
17	Luziânia – GO	<i>F. tucumaniae</i>	46	Passo Fundo – RS	<i>Fusarium</i> sp
18	Luziânia – GO	<i>F. tucumaniae</i>	47	Passo Fundo – RS	<i>F. brasiliense</i>
19	São João D'Aliança – GO	<i>F. tucumaniae</i>	48	Chapadão do Sul – MS	<i>F. brasiliense</i>
20	Rio Verde – GO	<i>F. tucumaniae</i>	50	Formosa – GO	<i>F. brasiliense</i>
21	Passo Fundo – RS	<i>F. tucumaniae</i>	52	Ponta Grossa – PR	<i>F. brasiliense</i>
22	Rio Verde – GO	<i>F. tucumaniae</i>	54	Passo Fundo – RS	<i>F. brasiliense</i>
23	Rio Verde – GO	<i>F. tucumaniae</i>	55	Ponta Grossa – PR	<i>F. brasiliense</i>
24	Planaltina – DF	<i>F. tucumaniae</i>	56	Londrina – PR	<i>F. brasiliense</i>
25	São João D'Aliança – GO	<i>F. brasiliense</i>	57	Cristalina – GO	<i>F. brasiliense</i>
26	PAD – DF	<i>F. brasiliense</i>	58	Chapadão do Sul – MS	<i>F. brasiliense</i>
27	Luziânia – GO	<i>F. brasiliense</i>	59	Cristalina – GO	<i>F. brasiliense</i>
29	Silvânia – GO	<i>F. tucumaniae</i>	60	Cristalina – GO	<i>F. brasiliense</i>
30	Silvânia – GO	<i>F. tucumaniae</i>	61	Cenargen	<i>F. solani</i>

*Classificação taxonômica segundo critérios morfológicos descritos por Aoki, et al. (2005).

¹ Isolados pertencentes à coleção.

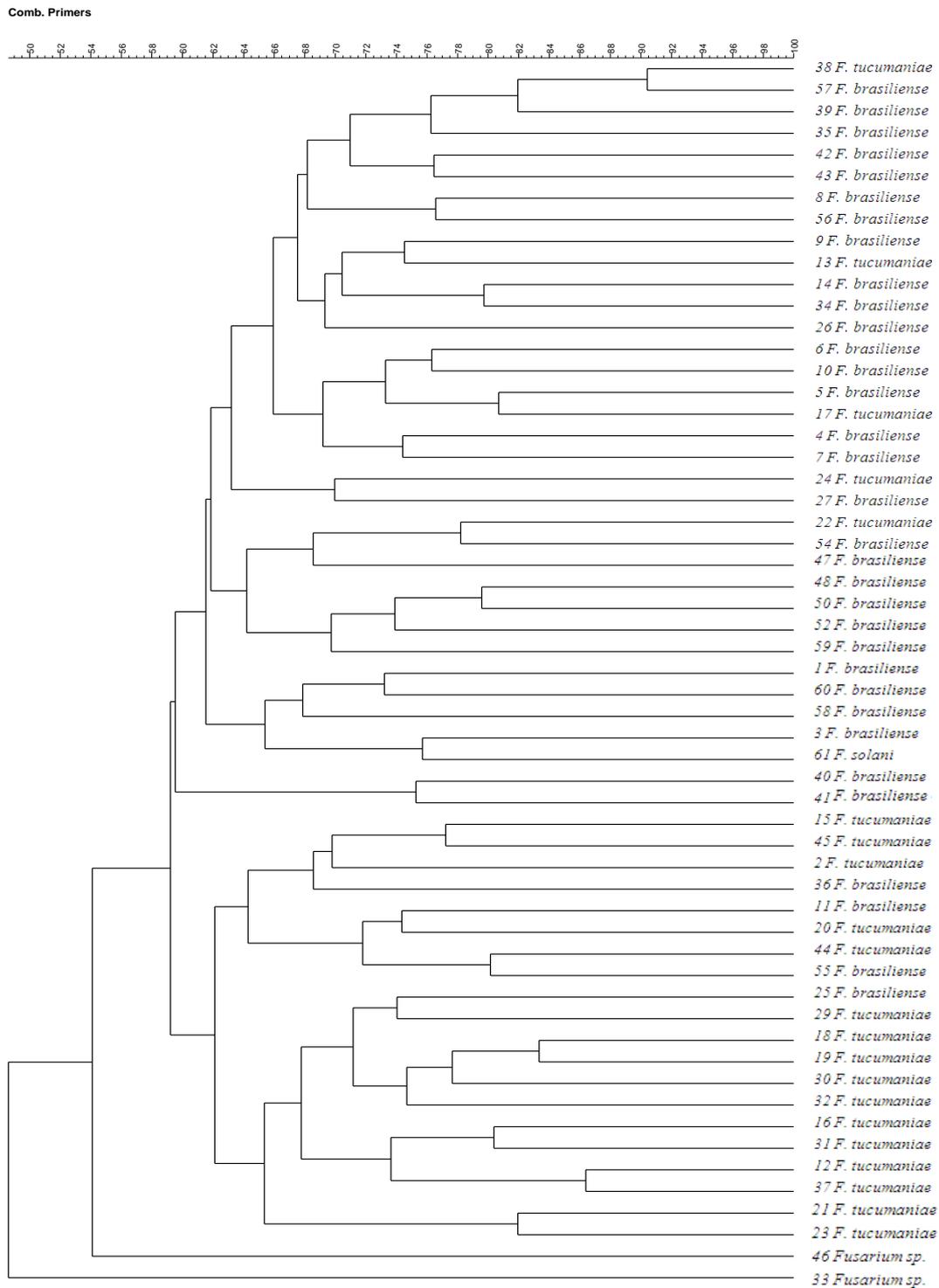
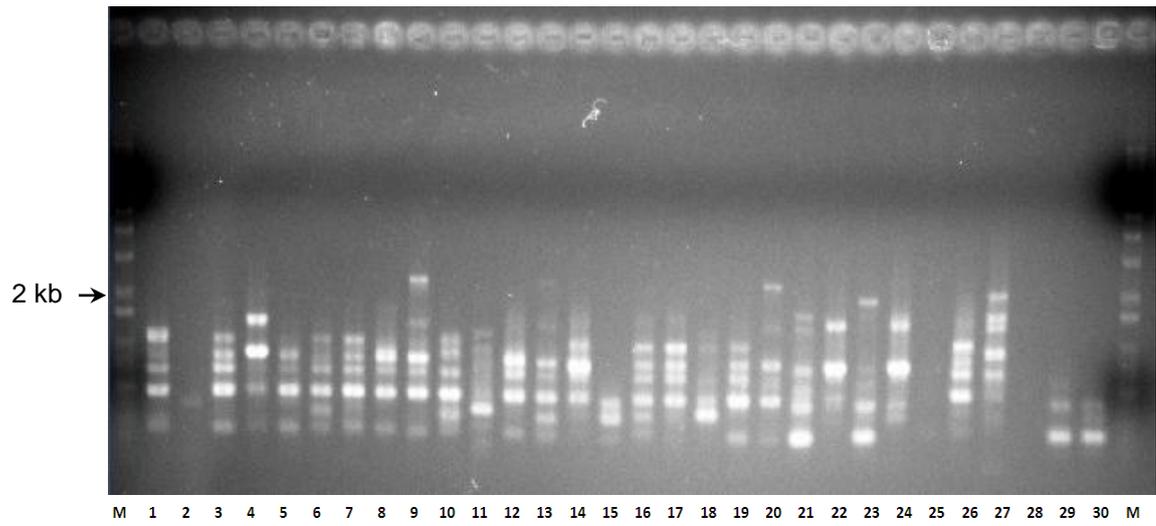


Figura 5. Análise de agrupamento de 57 isolados de *Fusarium* spp. com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando 1423 marcadores moleculares RAPD. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento. A barra superior corresponde ao percentual de similaridade.

Pente 1



Pente 2

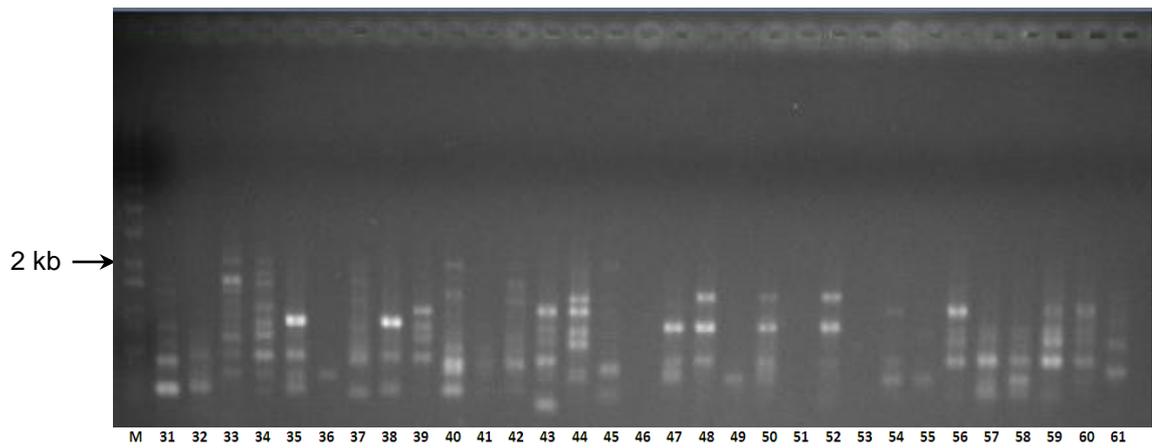


Figura 6. Perfis de RAPD amplificados com o primer OPG – 17 dos isolados estudados de *Fusarium* spp.

Primer 22

Primer 15

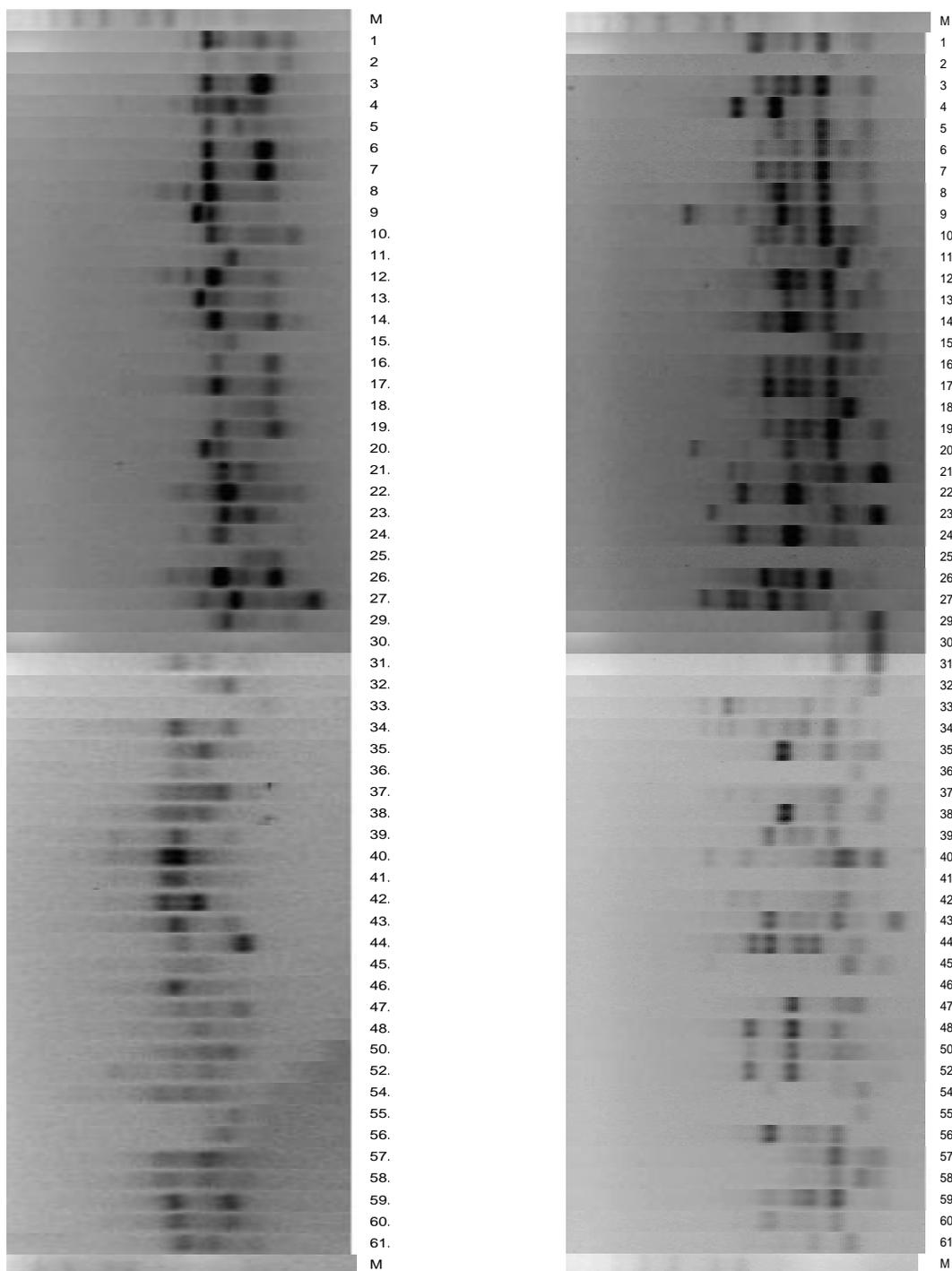


Figura 7. Análise de RAPD das ampliações como os primers, OPA - 3 e OPG -17, dos isolados estudados de *Fusarium* spp., gerados pelo programa Bionumerics.

Tabela 3. Componentes da reação de amplificação do DNA de *Fusarium* spp. e respectivas concentrações utilizadas em uma reação.

Reagentes	Concentração Estoque	Concentração Final	Uma reação (µl)
DNA	5 ηg/µl	12 – 15 ηg/µl	3,0
Buffer	5 X	1 X	1,3
MgCl ₂	50 mM	3 mM	0,78
dNTP	10 mM	0,1 mM	0,13
Primer	10 mM	0,4 µm	1,3
Taq	5 U/µl	1 U	0,20
H ₂ O Milli Q		Completar para 13 µl	6,29
Volume final	13 µl	13	13

Tabela 4. Componentes com quantidade e respectivas concentrações utilizadas no preparo da solução tampão CTAB.

Componente	Quantidade	[] final
CTAB 7%	10 g	2%
EDTA 0,5 M, pH 8,0	20 ml	20 mM
Tris-HCL 1 M, pH 8,0	50 ml	100 mM
NaCl 5 M	140 ml	1,4 M
Água milli-Q	500 ml	-

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Achenbach LA, Patrick J & Gray L (1996) Use of RAPD markers as a diagnostic tool for the identification of *Fusarium solani* isolates that cause soybean sudden death syndrome. *Plant Disease* 80: 1228-1232.

Aoki T, O'Donnell K, Homma Y, Lattanzi AR (2005) Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. *Mycoscience*, v. 46, p. 162-183.

Arruda GMT, Miller RNG, Ferreira MASV, Café-Filho AC (2005) Morphological and molecular characterization of the sudden death syndrome pathogen of soybean in Brazil. *Plant Pathology*, v. 54, p. 53-65.

Bentley S, Pegg KG, Dale JL (1995) Genetic variation among a world-wide collection of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* analysed by RAPD-PCR fingerprinting. *Mycological Research*, v.99, p.1378-1384.

Ferreira ME, Grattapaglia D (1996) Introdução ao uso de marcadores na análise genética. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 220p.

Fronza V (2003) Genética da reação da soja à *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. 2003. 154f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Fungaro MHP (2000) PCR na micologia. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v.14, p.12-16.

Li S, Tam YK & Hartman GL (2000) Molecular differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* from other *F. solani* based on mitochondrial small subunit rDNA sequences. *Phytopathology* 90: 491-497.

O'Donnell K & Gray LE (1995) Phylogenetic relationships of the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* inferred from rDNA sequence data on PCR primers for its identification. *Molecular Plant Microbe Interactions* 8: 709-716.

Pinazza LA (2007). *Cadeia produtiva da soja (Agronegócios ; v. 2)*. Brasília: MAPA.

Roessing AC & Guedes LCA (1993) Aspectos econômicos do complexo soja: sua participação na economia brasileira: evolução na região do Brasil Central. In: Arantes NE and Souza PIM (eds) *Cultura da Soja nos Cerrados*. Potafós, Piracicaba, pp 1-104.

Rohlf FJ (2000) NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. New York: Exeter Software, 98p.

Roy KW (1997) *Fusarium solani* on soybean roots: nomenclature of the causal agent of sudden death syndrome and identity and relevance of *F. solani* form B. *Plant Disease*, v. 81, p. 259-266.

Roy KW, Lawrence GW, Hodges HH, MClean KS, Killebrew JF (1989) Sudden death syndrome of soybean: *Fusarium solani* as incitant of *Heterodera glycines* to disease severity. *Phytopathology*, v. 79, p. 191-197.

Rupe JC (1989) Frequency and pathogenicity of *Fusarium solani* recovered from soybeans with sudden death syndrome. *Plant Disease*, v. 73, p. 581-584, 1989.

Sediyama T, Pereira MG, Sediyama CS, Gomes JLL (1985) Cultura da soja: I parte. Viçosa: UFV, 96p.

Sokal RR e Rohlf FJ (1962) The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon*, v.11, p.30-40.

Welsh J, MCClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, v.18, p.7213-7218.

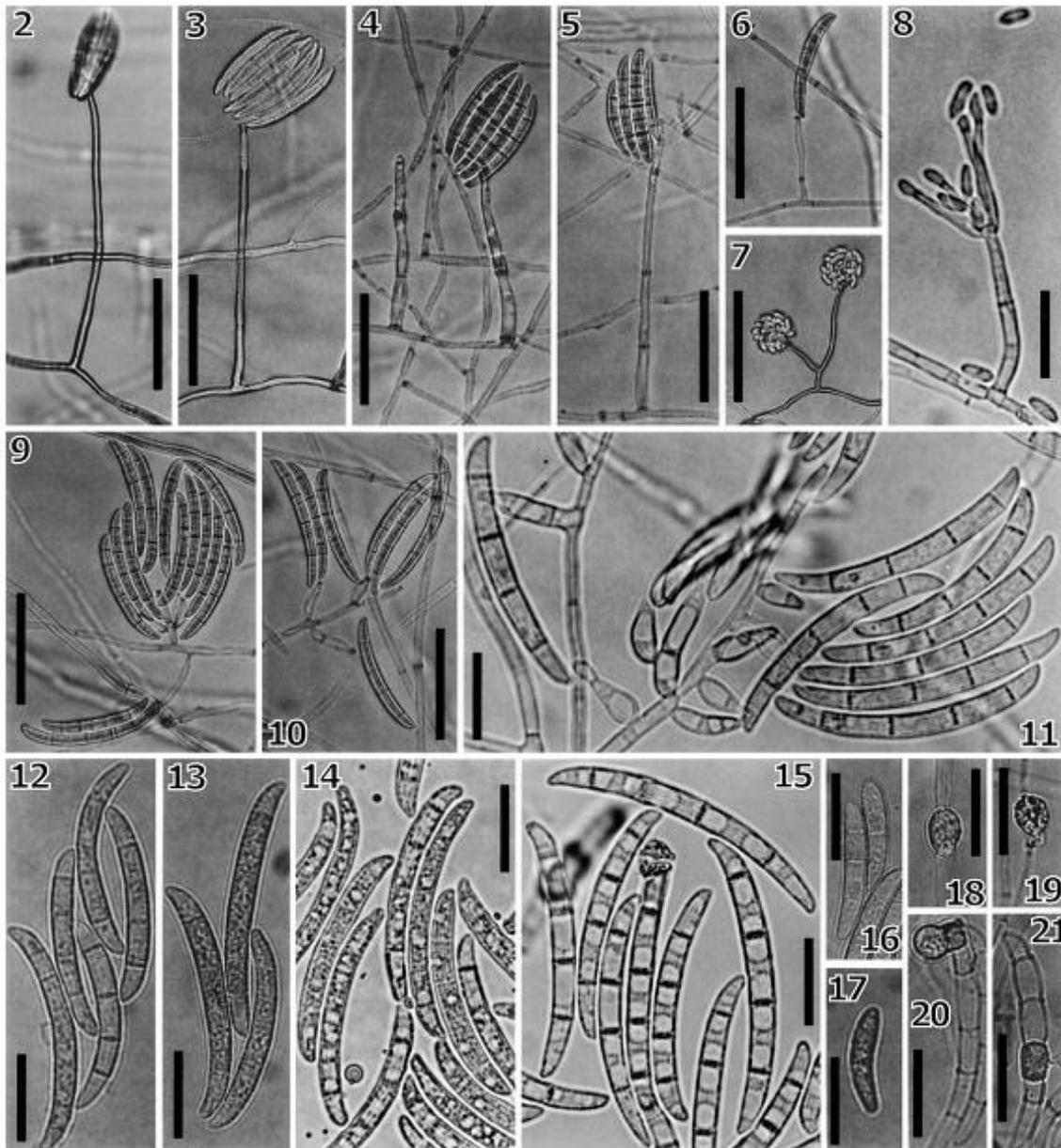
Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, v.18, p.6531-6535.

Yorinori JT (1994) Podridão vermelha da raiz, uma séria doença da soja e do feijão, causada por *Fusarium solani*. *Fitopatologia Brasileira*, v.19, p.333. /Resumo/

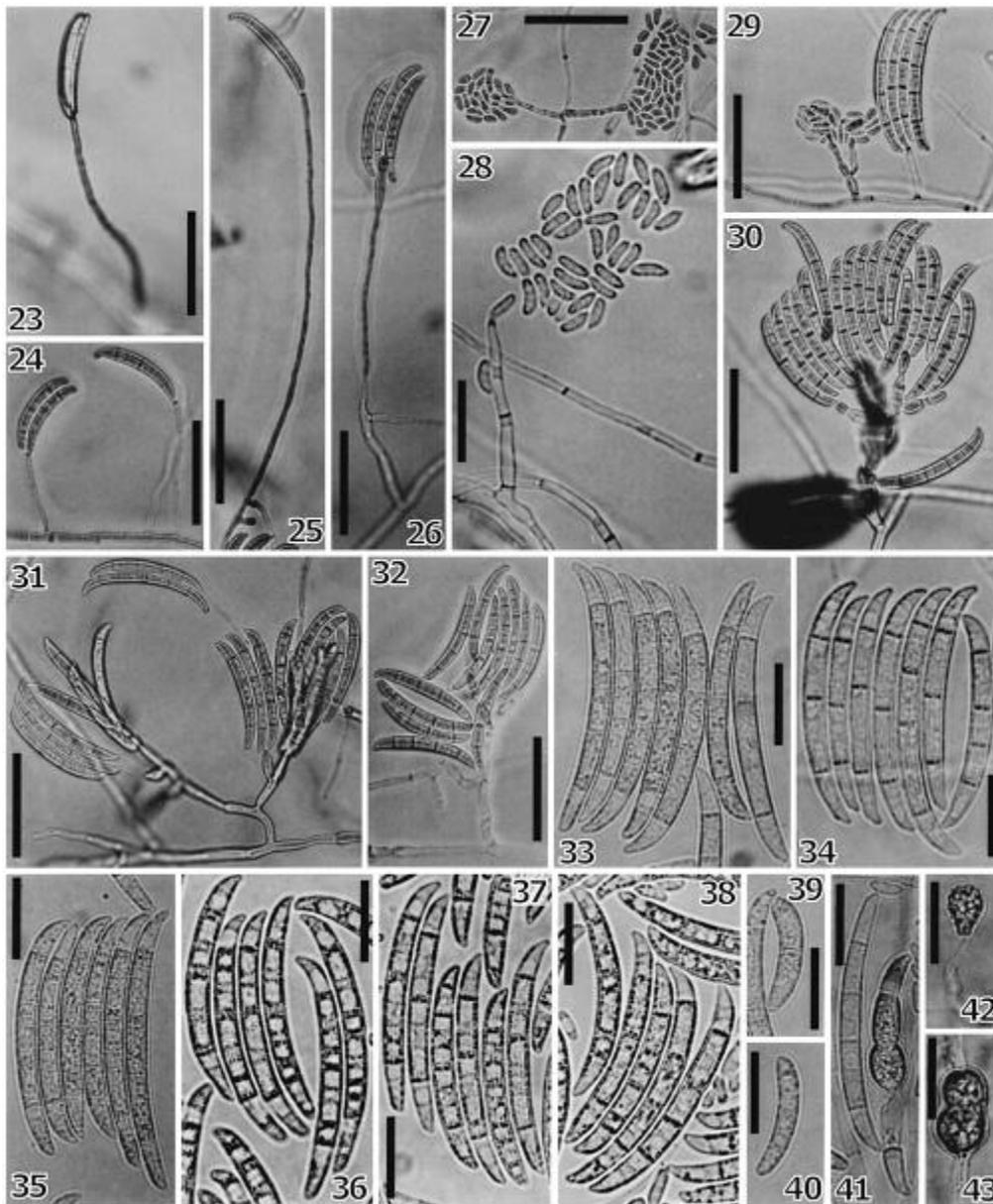
Yorinori JT, Charchar MJD, Nasser LCB, Henning AA (1993) Doenças de soja e seu controle. In: ARANTES, N. E.; SOUZA, P. I. M. Cultura da soja nos cerrados. Piracicaba: Potafos, p. 333-397.

Zolan M e Pukkila P (1986) Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Mol. Cell Biol.* 6:195-200

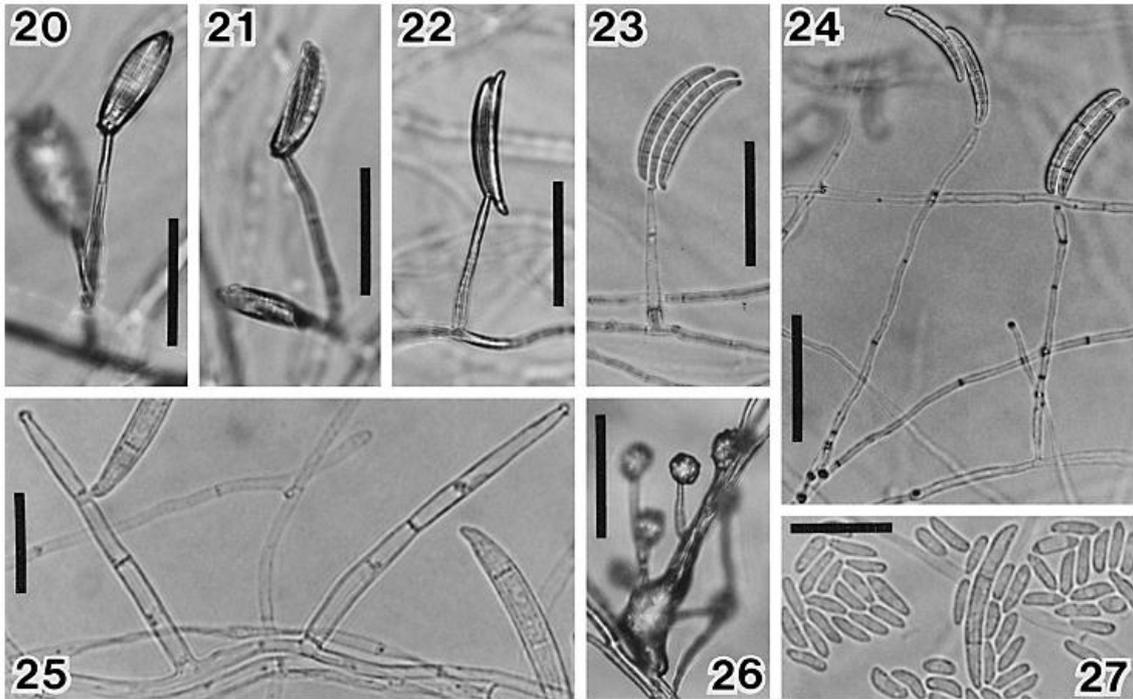
ANEXOS – Características de *Fusarium brasiliense*. *F. cuneirostrum*, *F. virguliforme* e *F. tucumanaiae*, segundo Aoki (2005) e Aoki (2003).



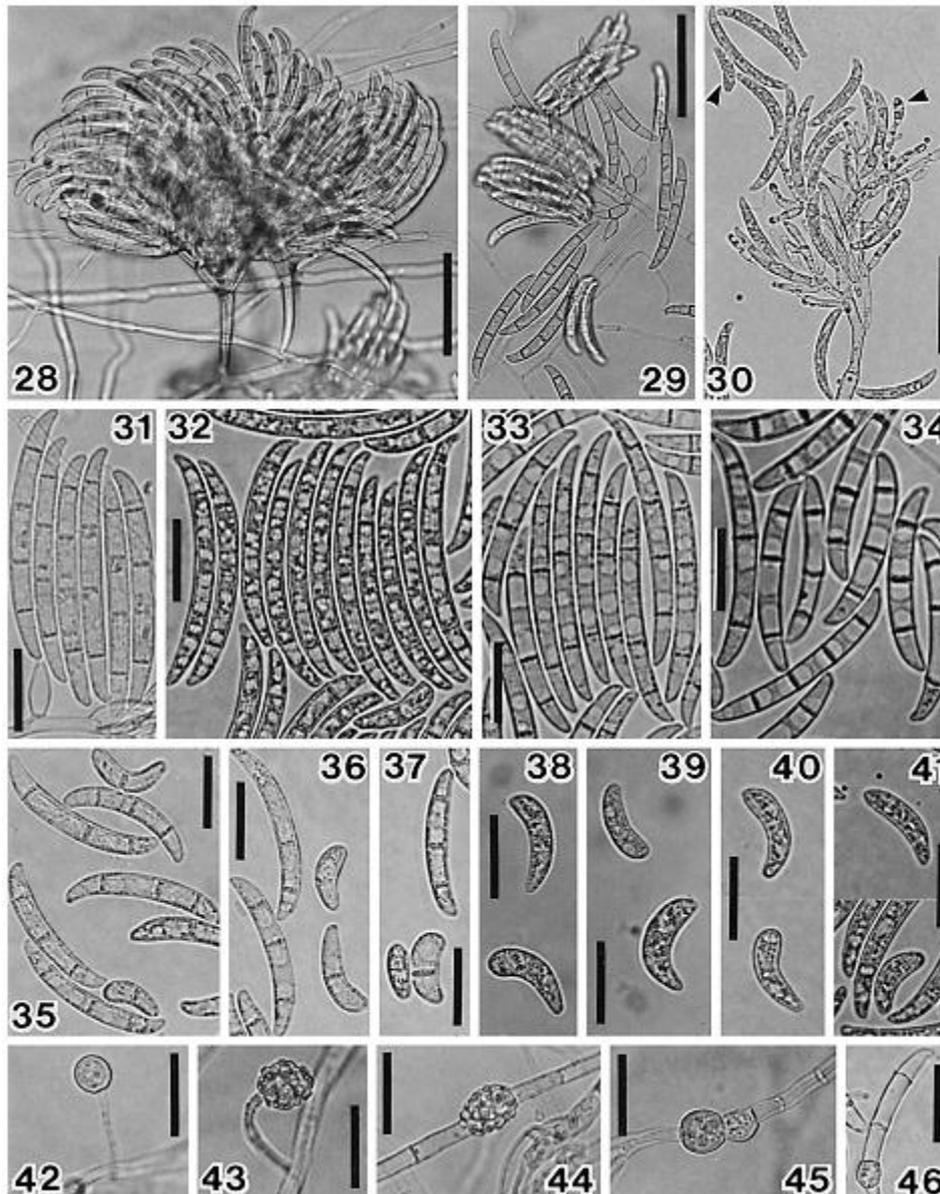
Figuras 2–21. Morfologia de *Fusarium brasiliense* cultivado em escuro (2–12, 18–21 em SNA; 13–17 em BDA; 8 e 11–21 montado em água). 2–6 Conídios formados em conidióforos finos em hifas na superfície do meio de cultura. 7 e 8 Microconídios formados em conidióforos curtos decorrentes de hifas na superfície do ágar. 9–11 Conídios esporoquiais e conidióforos. 12–15 Conídios esporoquiais cultivados em SNA (12) e BDA (13–15); septos são indistintos em conídios imaturos em BDA (13 e 14), mas tornam-se evidentes em conídios maduros (15). 16 e 17 levemente curvo, curto clavado, conídios esporoquiais septados formados em BDA. 18 e 19 clamidósporos nas hifas. 20 e 21 clamidósporos em conídios (Aoki, 2005).



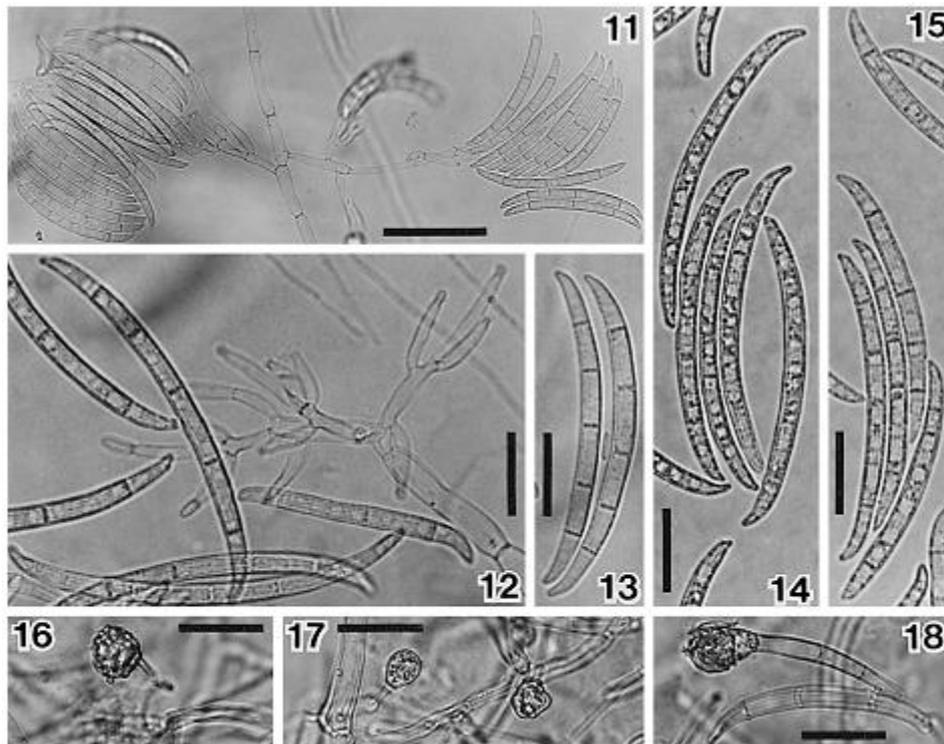
Figuras 23–43. Morfologia de *Fusarium cuneirostrum* cultivados no escuro (23-34,41-43 cultivadas em SNA; 35-40 cultivados em meio BDA; 28,33-43 montado em água). 23-26 conídios falciformes formados em conidióforos delgados decorrentes de hifas na superfície do ágar. 27 e 28 Microconídios formados em conidióforos curtos decorrentes de hifas na superfície do ágar. 29 microconídios formados em conidióforos curtos adjacente a um conidióforo esporoquial. 30-32 conídios e conidióforos esporoquiais formados na superfície do ágar. 33-38 conídios esporoquiais falciformes produzidos em SNA (33 e 34) e BDA (35-38); septos são indiscerníveis em conídios imaturos em BDA (35 e 36), mas tornam-se visíveis em conídios maduros (37 e 38). 39 e 40 conídio esporoquial levemente curvo, curto clavado 0-1 septo formada em cultura no BDA. 41 clamidósporos em conídios. 42 e 43 clamidósporos nas hifas (Aoki, 2005)



Figuras 20–27. Conídios e conidióforos de *Fusarium virguliforme* cultivadas em SNA no escuro (20–24,26: montado em água). 20–24. conídios aéreos falciforme formados em conidióforos delgados decorrentes de hifas em ágar. 25. Conidioforos delgados, ramificados. 26. Microconídios formados em conidióforos curtos em cabeça falsa. 27. Conídios aéreos septados, curtos, clavado a oblongo (Aoki, 2005).



Figuras 28-46. Conídios esporodóquiais, conidióforos e clamidósporos de *Fusarium virguliforme* cultivados no escuro (28: vista aérea, 29-46: montado em água) 20, 28 e 30 conidióforos ramificados formando esporodóquio, conídios falciforme, cilíndricos curvados; microconídios em forma de vírgula formados no mesmo conidióforo. 31-34. conídios esporodóquiais observados em SNA (31) e BDA (32-34); septação é obscurecida em conídio jovem em BDA (32), mas se torna claro como vacúolos na forma de conídios (33,34). 35-41 conídios em forma de vírgula formados apenas em BDA. 42-45 clamidósporos terminais ou intercalados nas hifas. 46: Clamidósporos de conídios. 28, 29, 31, 42-45 cultivadas em SNA e 30, 32-41, 46 em BDA (Aoki, 2003).



Figuras 11–18. Conídios esporoquiais, conidióforos e clamidósporos de *Fusarium tucumaniae* cultivadas no escuro (montado em água) 11 e 12: conidióforos ramificados formando conídios falciforme, cilíndricos e curvados. 13-15: conídios esporoquiais, observado em SNA (13) e BDA (14 e 15); septação é obscurecida em conídios imaturos em BDA (14), septos ficam mais claros em conídios maduros (15). 16 e 17: clamidósporos em hifas. 18: Clamidósporo em conídio. 11-13, 16-18 cultivadas sobre SNA, e 14 e 15 em BDA (Aoki, 2003).