



**ANANDA DOS SANTOS VIEIRA**

**INTERAÇÃO COM SEMENTES DE SOJA E  
SENSIBILIDADE DE *Phytophthora sojae* A FUNGICIDAS IN  
VITRO**

**LAVRAS – MG  
2022**

**ANANDA DOS SANTOS VIEIRA**

**INTERAÇÃO COM SEMENTES DE SOJA E SENSIBILIDADE DE *Phytophthora sojae*  
A FUNGICIDAS IN VITRO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras,  
como parte de exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Agronomia//Fitopatologia, área de  
concentração em Fitopatologia  
para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. José da Cruz Machado  
Orientador

Profa. Dra. Maria Luiza Nunes  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2022**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Vieira, Ananda dos Santos.

Interação com sementes de soja e sensibilidade de  
*Phytophthora sojae* a fungicidas in vitro / Ananda dos Santos  
Vieira. - 2022.

55 p. : il.

Orientador(a): José da Cruz Machado.

Coorientador(a): Maria Luiza Nunes.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Podridão radicular. 2. Tratamento de sementes. 3.  
Transmissão. I. Machado, José da Cruz. II. Nunes, Maria Luiza. III.  
Título.

**ANANDA DOS SANTOS VIEIRA**

**INTERAÇÃO COM SEMENTES DE SOJA E SENSIBILIDADE DE *Phytophthora sojae* A FUNGICIDAS IN VITRO**

**INTERACTION WITH SOYBEAN SEEDS AND SENSITIVITY OF *Phytophthora sojae* TO FUNGICIDES IN VITRO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras,  
como parte de exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Agronomia//Fitopatologia, para  
obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 18/08/2022

Dr. José da Cruz Machado UFLA  
Dra. Antonia Reis Figueira UFLA  
Dra. Iara Euleteria CORTEVA

Prof. Dr. José da Cruz Machado  
Orientador

Profa. Dra. Maria Luiza Nunes  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2022**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente e acima de tudo à Deus por ter me abençoado e mostrado o caminho devo seguir até hoje e Nossa senhora das Graças por serem a fortaleza que necessito.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia pela infraestrutura oferecida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Ao professor José da Cruz Machado, por toda orientação e assistência sem hesitar em nenhum momento.

As minhas antigas orientadoras Solange Veras e Maria Geralda Souza, por todo incentivo, amizade e pelos anos de orientação e ajuda incondicional.

Aos meus pais Helena e Jorge Vieira pelo apoio, ajuda, incentivo e amor incondicional, sem vocês não poderia estar aqui hoje. Minha eterna gratidão e amor.

Aos meus tios Renato, Jacy e Terezinha por todo amor e apoio sempre.

Minha madrinha Marcia por todo amor, apoio, incentivo e carinho a todo momento sempre além do meu priminho mais amado Henrique para que ele tenha exemplo de que perseguir seus sonhos os tornam realidade.

À Lívia Dal Sasso por todo apoio incondicional, ajuda, companheirismo e incentivo durante a maior parte do mestrado, meu eterno carinho e gratidão.

Aos meus amigos Ana Larrat, Thiago Victor, Caroline Campos, Adrea Regina, Thayane Maues, Amanda Leal, Claudia Veiga, Gabriella Alves, Larissa Fernanda, Lara Nascimento e Tiago Yukio pelo apoio e amizade que levo comigo sempre.

À Ariane Alvarenga, pela amizade e suporte.

À equipe do Laboratório de Patologia de Sementes, Iara Euleteria, Caroline Siqueira, Nevenka Moura, Angela Santos e Guilherme Foschetti pelo apoio e ajuda durante o período do mestrado. À todos os professores do Departamento de Fitopatologia da UFLA, pelo compartilhamento do conhecimento.

À todos que direta ou indiretamente me ajudaram nesse processo, agradeço.

## RESUMO

A transmissão e a disseminação da *Phytophthora sojae* em relação a semente de soja ainda se mantêm com aspectos pouco esclarecidos, e que são de extrema importância no âmbito epidemiológico deste patossistema. Sabe-se que a podridão de fitóftora, causada pelo referido patógeno, tem sido registrada em uma grande área de produção de soja no Brasil. O propósito deste trabalho, foi avaliar em condições controladas, a relação de *P. sojae* com sementes de soja, tendo como focos principais avaliar a potencialidade de transmissão do patógeno de planta para sementes e verificar os efeitos e a viabilidade e longevidade deste organismo em sementes após a colheita. Foi propósito também deste estudo avaliar a sensibilidade de *P. sojae* a alguns fungicidas em fase experimental no Brasil visando a utilização destes produtos em tratamento de sementes de soja. Para estes estudos foram utilizados um isolado de *P. sojae* e três cultivares de soja consideradas suscetíveis a podridão de fitóftora. A transmissibilidade do patógeno de plantas/vagens inoculadas às sementes foi avaliada por meio de dois métodos de inoculação em casa de vegetação. As avaliações constaram de testes de sanidade e germinação padrão. Para avaliação de efeitos e viabilidade de *P. sojae* a partir de sementes inoculadas em condições controladas de laboratório utilizou-se a técnica de condicionamento hídrico com dois níveis de inóculo, equivalentes a exposição das sementes às colônias do patógeno pelos tempos de 48 e 96 horas. Os efeitos do patógeno foram avaliados pelo teste de emergência em substrato de areia + composto orgânico e a viabilidade pelo teste de sanidade com plaqueamento de partes das plantas emergidas. Para o teste de sensibilidade do patógeno a fungicidas foram utilizados 3 produtos com princípios ativos distintos e dois produtos comerciais já registrados para oomycetes e um isolado do patógeno. As avaliações foram feitas por meio de medições diárias de diâmetro de crescimento micelial e observações de características morfológicas das colônias desenvolvidas no período de incubação. Os resultados deste estudo revelaram que *P. sojae* não foi detectado em sementes colhidas de vagens inoculadas em dois estádios de desenvolvimento. A transmissão do patógeno a partir de sementes somente ocorreu com as sementes recém inoculadas, não havendo viabilidade do patógeno em sementes secas avaliadas a partir do final do primeiro mês de armazenamento. A partir de sementes recém inoculadas o patógeno foi capaz de causar danos significativos ao desempenho das sementes e plantas emergidas. Pelo ensaio de sensibilidade de *P. sojae* a fungicidas, os resultados mostraram que Oxathiapiprolin foi o ingrediente mais eficaz em reduzir o crescimento micelial de *P. sojae* ao lado dos produtos Maxin Advanced e Apron, sendo o mesmo uma das alternativas atuais para a formulação de misturas que possam ser utilizadas pelos agricultores no tratamento de sementes de soja.

**Palavras-Chave:** Podridão radicular. Transmissão. Efeitos. Tratamento de sementes.

## ABSTRACT

The transmission and dissemination of *Phytophthora sojae* regarding soybean seed still remain as aspects that are poorly understood, and that they are of extreme importance in the epidemiological scope of this pathosystem. It is known that *Phytophthora* rot, caused by this pathogen, has been reported in a large area of soybean production in Brazil. The purpose of this work was to evaluate, under controlled conditions, the relationship of *P. sojae* with soybean seeds, with the main focus on evaluating the potentiality of transmission of the pathogen from plant to seed and to verify the effects and viability and longevity of this organism in seeds after harvest. It was also the purpose of this study to evaluate the sensitivity of *P. sojae* to some fungicides in experimental phase in Brazil aiming at the use of them in soybean seed treatment. For these studies, an isolate of *P. sojae* and three soybean cultivars considered susceptible to phytophthora rot were used. The transmissibility of the pathogen from inoculated plants/pods to seeds was evaluated using two inoculation methods in a greenhouse. The evaluations were carried out by using sanity and standard germination tests. To evaluate the effects and viability of *P. sojae* from inoculated seeds under controlled laboratory conditions, it was used the technique of water conditioning with two levels of inoculum, equivalents to the exposure of seeds to colonies of the pathogen for 48 and 96 hours. The effects of the pathogen were evaluated by the emergence test in organic compost amended with sand and the viability by the health test by plating fragments of the emerged plants. For the fungicide sensitivity test, three products with distinct active ingredients and two commercial products already registered for oomycetes and one isolate of the pathogen were used. Evaluations were made by daily measurements of mycelial growth diameter and observations of morphological characteristics of the colonies developed during the incubation period. The results of this study revealed that *P. sojae* was not detected in seeds harvested from inoculated pods at two developmental stages. Transmission of the pathogen from seed only occurred in freshly inoculated seed, and there was no viability of the pathogen in dry seed evaluated after the first month of storage. From freshly inoculated seed, the pathogen was able to cause significant damage to seed performance and emerged plants. By testing the sensitivity of *P. sojae* to fungicides, the results showed that Oxathiapiprolin was the most effective ingredient in reducing the mycelial growth of *P. sojae* comparable to Maxin Advanced and Apron. Such product is a potential alternative for formulation of commercial products that may be used by farmers in the treatment of soybean seeds.

**Keywords:** Root rot. Transmission. Effects. Seed treatment.

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>11</b>
2.1 Interação patógenos e sementes na cultura da soja .....	11
2.2 Podridão radicular de fitóftora ( <i>Phytophthora sojae</i> ) .....	12
2.3 Características de <i>Phytophthora sojae</i> .....	14
2.4 Associação de <i>Phytophthora sojae</i> com sementes e outras partes das plantas de soja.....	15
2.5 Tratamento sanitário de sementes de soja no controle de <i>Phytophthora sojae</i> .....	17
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
3.1 Local e realização dos ensaios .....	19
3.2 Obtenção e multiplicação de <i>P. sojae</i> .....	19
3.3 Avaliação da transmissibilidade do patógeno de plantas às sementes em condições controladas .....	19
3.3.1 Avaliações da ocorrência de <i>P. sojae</i> e germinação das sementes colhidas.....	22
3.3.1.1 Teste de sanidade.....	22
3.3.1.2 Teste de germinação.....	22
3.4 Avaliação de efeitos e viabilidade de <i>P. sojae</i> em sementes inoculadas.....	23
3.4.1 Teste de sanidade das sementes .....	23
3.4.2 Teste de germinação .....	23
3.4.3 Teste de emergência em substrato com areia .....	24
3.4.4 Avaliação da viabilidade de <i>P. sojae</i> em sementes de soja armazenadas .....	24
3.5 Avaliação da sensibilidade de <i>P. sojae</i> a alguns fungicidas em fase de experimentação para tratamento de sementes de soja in vitro .....	25
3.6 Análise estatística.....	26
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
4.1 Transmissibilidade de <i>Phytophthora sojae</i> de plantas as sementes de soja.....	27
4.2 Avaliação de efeitos e viabilidade a partir de sementes inoculadas com <i>P. sojae</i> in vitro.....	28
4.3 Avaliação da sensibilidade de <i>P. sojae</i> a alguns fungicidas em fase de experimentação para tratamento de sementes de soja in vitro .....	39
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>48</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja constitui uma das mais importantes atividades do Agronegócio brasileiro sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial de grãos desta espécie. (CONAB, 2021). A produção de soja na safra 2022/23 é de 153.583,2 mil toneladas (até o momento) ocupando uma área de cultivo de 43.242,3 mil ha, havendo um aumento de 4,2% em relação à safra anterior (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2022).

O grande destaque do Brasil no mercado internacional de commodities agrícolas se dá pela conjugação de diversas características que favorecem a este tipo de atividade, como clima, solo, disponibilidade de recursos hídricos, tecnologias atualizadas, dentre outras. Além disso, o país também se sobressai por possibilitar em algumas regiões a realização de dois cultivos em um ano, no período chuvoso (verão), o que proporciona maior exploração de uma mesma área, maior produção e conseqüentemente, maiores retornos econômicos (GESTEIRA, 2017).

Durante o ciclo de desenvolvimento da soja, uma vasta gama de doenças pode incidir sobre a cultura, causando redução da produtividade e qualidade dos grãos ou sementes produzidas (MAIS SOJA, 2020), resultando em perdas econômicas que culminam com desequilíbrios sociais dos mais drásticos.

Dentre as doenças mais importantes de soja no Brasil, encontra-se a podridão radicular, causada por *Phytophthora sojae*, que é considerada uma das mais danosas nesta cultura. Trata-se de uma doença que pode provocar reduções de rendimento de grãos de até 100% em cultivares altamente suscetíveis (COSTAMILAN et al., 2007). A infecção da soja por *P. sojae*, que é um organismo hemibiotrófico, inicia-se abaixo da região do colo onde eventualmente produz podridões destruindo os tecidos radiculares e indo até o caule, a partir de onde pode infectar plantas em qualquer estágio de desenvolvimento da cultura desde a emergência até a fase de planta adulta.

Os sintomas da podridão de fitóftora em soja observados no campo seguem normalmente um padrão linear na planta atacada e mais frequentemente nas plantas situadas nas bordas das lavouras, em solo argiloso e com sinais de compactação (ROESE et al., 2018). O conhecimento do comportamento e peculiaridades de *P. sojae* em um dado ambiente e no hospedeiro é essencial para o manejo da doença.

Dados de literatura indicam que a referida doença tem causado perdas de até dois milhões de toneladas de grãos/ano nos Estados Unidos (SCHMITTHENNER & DORRANCE, 2015). No Brasil e Argentina, a podridão de fitóftora ocupa a sétima posição

entre doenças que mais causam perdas de rendimento de grãos de soja (HARTMAN, 2015). Entretanto, dados mais recentes em relação a perdas econômicas causadas pela referida doença no Brasil parecem estar subestimados em razão de dificuldades de se diagnosticar a doença na presença de outras que causam sintomas semelhantes.

Informações sobre a associação de *P. sojae* com sementes de soja em literatura são escassas e insuficientes para conclusões mais concretas sobre este tipo de relação. Estudos conduzidos por JIN et al (1999) apontaram que o patógeno pode associar-se às sementes de soja a partir de plantas infectadas mas permanece a dúvida sobre a sobrevivência posterior do mesmo em sementes secas na fase de pós-colheita. Com base em estudos já realizados com outros patossistemas envolvendo diferentes espécies de *Phytophthora* fica evidente que mais estudos são necessários para conclusões mais seguras sobre o grau de associação de *P. sojae* com sementes de soja. Entende-se que diversos fatores que condicionam este tipo de relação devem ser investigados de forma integrada. Vale ressaltar que a simples presença do inóculo nas sementes não significa garantia de estabelecimento da doença nas fases posteriores de desenvolvimento das plantas.

No âmbito da fitopatologia, sabe-se que a resistência genética é o método mais eficaz para o controle de fitodoenças em geral. Na prática este método, que nem sempre é disponibilizado para doenças como a podridão de fitóftora em soja, deve ser somado a outras medidas como práticas culturais adequadas, controle químico e biológico, entre outras. Através do tratamento de sementes inúmeras doenças causadas por espécies de *Phytophthora* podem ser controladas e esta prática surge como uma das ferramentas das mais eficazes para o controle preventivo de diversas doenças.

Em relação ao tratamento de sementes para controle de doenças causadas por Oomycetes, atualmente o uso de produtos à base de Metalaxil, Mefenoxam e mais recentemente Oxathiapiprolin tem sido mais empregado na maioria dos cultivos agrícolas. Outros produtos tradicionais de espectro mais amplo e que atuam por mecanismos de contato, como é o caso de Thiram, Clorotalonil, etc já encontram dificuldades de controlar com mais eficácia doenças como as podridões radiculares como no caso da podridão de fitóftora em soja.

O propósito deste trabalho, foi avaliar em condições controladas de ambiente a relação de *P. sojae* com sementes de soja, tendo-se como foco pontual checar a potencialidade de transmissão do fungo de planta para sementes e uma vez presente nas sementes, verificar a viabilidade e longevidade do patógeno na fase pós-colheita da soja. Foi propósito também deste estudo avaliar a sensibilidade de *P. sojae* a alguns fungicidas em

fase experimental no Brasil em comparação com produtos já registrados oficialmente no país visando ao controle da doença em questão.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Interação patógenos e sementes na cultura da soja

A associação patógeno – semente é um fenômeno já conhecido mundialmente e que tem sido responsável por uma série de consequências danosas ao desenvolvimento e produção de plantas na natureza. Segundo Richardson (1979), acima de 1500 agentes podem ser transportados por sementes de mais de 600 gêneros de plantas, sendo esses números alterados no tempo devido a expansão das áreas de produção e diversificação do uso das plantas para várias finalidades (alimentícias, farmacêutica, cosméticos, etc). A associação entre patógeno - semente é uma das maneiras que favorecem a sobrevivência e a disseminação desses microrganismos em locais diferentes além de manter suas estruturas viáveis por longos períodos de tempo, sendo importante ressaltar que a semente é o insumo mais importante para a implementação de uma lavoura. A associação de fitopatógenos pode se dar de três formas: i. aderidos na superfície da semente, ii. no interior da semente e/ou iii, misturados a elas no lote.

Machado e Pozza (2005), entre outros autores, relatam, dentre as consequências, a perda do poder germinativo e vigor das sementes, introdução aleatória e precoce de inóculo nas áreas de plantio, acúmulo de inóculo no solo, aumento da suscetibilidade de plantas a estresses variados, morte de plântulas originadas de sementes contaminadas, contaminação e possível inutilização temporária de áreas para o cultivo de algumas espécies vegetais, contaminação de equipamentos de beneficiamento de sementes, disseminação do patógeno a longas distâncias, queda de produção e de qualidade, entre outros.

O entendimento da associação desses microrganismos patogênicos com as sementes é de fundamental importância, pois este tipo de interação pode afetar a quantidade e qualidade do produto final (RESENDE, 2016). Cada doença tem destaque em uma época do ano e em determinada região, variando de acordo com diversos fatores, principalmente as condições climáticas do local. O acesso do patógeno às sementes pode ser influenciado por inúmeros fatores, entre os quais a própria natureza do parasitismo de cada organismo.

Um dos fatores que se deve levar em conta para demonstrar a importância de se conhecer e estudar de forma mais aprofundada essa relação da semente com patógenos é a dimensão econômica, ela deve ser avaliada tomando-se como base a própria expressão econômica de cada doença envolvida, sendo esse tipo de estudo pouco relatado na literatura.

Considerando-se a safra 2021/2022 onde foi plantada 40.988,5 mil ha, e registrada

uma produção de 124.268,0 mil ton, observou-se diminuição de 10% em relação a safra passada devido a condições climáticas desfavoráveis. De modo geral, a soja é suscetível a inúmeras doenças cujos agentes causais estão distribuídos entre os grupos de fungos, bactérias, vírus, nematoides e Chromistas.

As doenças mais comuns encontradas nas diferentes regiões produtoras de soja no Brasil e que estão associadas às sementes desta cultura pertencem ao Grupo dos fungos e Chromistas. Entre estas doenças, consideradas de maior risco no país estão: mofo-branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, antracnose, causada por *Colletotrichum truncatum*, seca de hastes e vagens, causada por *Phomopsis sojae*, podridão radicular de fusarium, causada por diversas espécies de *Fusarium*, podridão e mela causada por *Rhizoctonia solani*; podridão cinzenta, causada por *Macrophomina phaseolina*; manchas foliares, causadas por espécies de *Cercospora*, *Peronospora* e *Corynespora*; e podridão radicular, causada por *Phytophthora sojae* (HENNING et al., 2014; SARAN, 2017)

Segundo dados de literatura até 1981, já haviam sido encontradas 35 espécies de fungos transmitidos pelas sementes de soja (GOULART, 2004) sendo alguns deles organismos hemibiotróficos, ou seja, tem o mesmo tipo de classificação em relação a colonização que *P. sojae*. Tem-se três exemplos de patógenos hemibiotróficos de grande importância que são transmitidos por sementes de soja: *Colletotrichum truncatum* causador da antracnose no campo e de deterioração de sementes e *Fusarium semitectum* e *F. graminearum* causando problemas de germinação e deterioração de sementes além da podridão em raiz. Esses patógenos demonstram que patógenos hemibiotróficos têm condições de se associar e serem transmitidos a partir de sementes infectadas, tendo sua viabilidade limitada em relação a tempo de armazenamento, o que constitui uma medida auxiliar no controle de doenças.

## **2.2 Podridão radicular de fitóftora (*Phytophthora sojae*)**

O primeiro relato de ocorrência da podridão da raiz e da haste da soja ocorreu em 1948, no Estado de Indiana (Estados Unidos). Em 1951 severos danos foram observados ocasionando elevadas perdas nas lavouras de soja no Estado de Ohio onde até hoje é uma das doenças mais severas e danosas a produção desta cultura.

Desde então, a doença tem sido relatada em diversos países, incluindo o Brasil, onde foi descrita pela primeira vez na safra de 1994/1995 no Rio Grande do Sul. Entretanto, as perdas em níveis significativas nas lavouras brasileiras foram registradas na safra

2006/2007 (COSTAMILAN; BERTAGNOLLI; MORAES, 2007), quando a doença ocorreu em várias lavouras do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul. Mais recentemente na safra 2018/2019, o patógeno causou perdas expressivas na região norte do Rio Grande do Sul, onde diversas lavouras foram ressemeadas com a cultura da soja, em virtude de perdas de mais de 60% do estande de plantas por tombamento (COSTAMILAN et al., 2018).

A infecção da soja por *P. sojae*, que é um organismo hemibiotrófico, inicia-se abaixo da superfície do solo e eventualmente produz podridões que se espalham destruindo os tecidos radiculares e atingindo o caule. Trata-se de uma doença que pode infectar plantas de soja em qualquer estágio de desenvolvimento desde a emergência até plantas adultas.

Draper e Chase (2001) descreveram os sintomas da podridão radicular e da haste de fitóftora de acordo com os estágios de desenvolvimento da cultura, os quais se dividem em 3 fases: Fase da podridão de sementes, onde os sintomas da infecção ocorrem depois do intumescimento da semente e antes da germinação; fase de tombamento (damping-off), que ocorre após a emergência a qual leva a planta rapidamente a murchar e morrer e pode tornar o tecido do hipocótilo escuro com aspecto encharcado; fase de podridão de caule e raiz, onde o patógeno invade a planta através das raízes e cresce dentro da haste causando sintoma de descoloração marrom-escuro que se desenvolve ao longo do caule da planta a partir do nível do solo, sendo esse um sintoma de fácil detecção visual em campo. Nesta última fase a planta infectada apresenta sintoma de murchar das folhas, pecíolos e queda das folhas.

Plantas mais jovens desenvolvem sintomas de amarelecimento mais rapidamente, acompanhada de podridão mole, já plantas mais velhas apresentam redução de vigor, um amarelecimento de folhas mais baixas que vão progredindo por toda a planta, levando a murchar e sua consequente morte. Também é observado que o sistema radicular fica severamente comprometido e as raízes laterais são quase todas deterioradas (DORRANCE; MILLS, 2009).

Os sintomas da podridão de fitóftora em soja observados no campo são bem característicos, normalmente na mesma linha e mais frequentemente nas bordas das lavouras, em solo argiloso e com sinais de compactação, pode ter similaridade com sintomas de leve deficiência de nitrogênio. De acordo com a literatura, esta situação predispõe as plantas à ocorrência da doença, ao favorecer a presença de água livre no solo, permitindo assim que os zoósporos de *P. sojae* migrem para as raízes das plantas. (ROESE et al., 2018)

O conhecimento do comportamento e peculiaridades de *P. sojae* em um dado ambiente e hospedeiro é essencial para o manejo da doença.

### **2.3 Características de *Phytophthora sojae***

*Phytophthora* constitui-se um importante gênero de fitopatógenos e possui uma ampla gama de hospedeiros, encontrando-se distribuída por todo o mundo (ERWIN; RIBEIRO, 1996). Foi descrito primeiramente por Anton de Bary, em 1875, devido a devastação provocada por *P. infestans* nos batatais da Irlanda. O gênero abrange cerca de 80 diferentes espécies, associadas a uma vasta gama de hospedeiros, constituindo mais de mil patossistemas.

*Phytophthora sojae* é um organismo oomiceto patogênico a soja, classificado no reino Chromista. Membros deste grupo são organismos filogeneticamente relacionados às algas e a alguns organismos eucarióticos anteriormente conhecidos como protistas (ROSSMAN; PALM, 2007; SOUZA et al., 2007). Entre outras características, no caso da *Phytophthora*, possui celulose na parede celular e não quitina, são dicarióticos na fase vegetativa e não sintetizam ergosteróis, como os fungos verdadeiros.

O patógeno é homotálico (estruturas sexuais femininas e masculinas presentes no mesmo indivíduo), o micélio é cenocítico (sem septos) em colônias novas e quando mais velho septado. Desenvolve oósporos, que são rapidamente formados após fertilização do oogônio, em meio de cultura ou em tecido infectado. O diâmetro de oósporos dormentes varia e sua temperatura ideal para formação e germinação é 24 °C (COSTAMILAN et al., 2007). Esporângios terminais são de dimensões variáveis podendo germinar diretamente, atuando como conídios, ou indiretamente, pela liberação de zoósporos biflagelados (COSTAMILAN; CLEBSCH, 2016). A temperatura ideal para crescimento da maioria dos isolados é entre 25 °C e 28 °C, e os meios de cultivo em ágar mais comuns são à base de suco V8, farinha de milho, feijão lima e BDA (COSTAMILAN; CLEBSCH, 2016) além de extrato de tomate.

Os esporângios formados se acumulam no solo até que ocorra um encharcamento no ambiente onde são liberados, se movimentando a curtas distancias (1 cm ou menos) ou sendo levados por corrente de água em direção das raízes de soja. A doença é favorecida por temperaturas próximas a 25 °C e por água livre disponível no solo, devido à textura argilosa, à compactação e a prolongados períodos de saturação de umidade, que provocam a liberação e a disseminação de zoósporos. (COSTAMILAN et al., 2007)

Waterhouse (1963) propôs uma chave para classificação de espécies onde foi feita uma divisão do gênero em 6 grupos, *P. sojae*, na sinonímia *P. megasperma* var. *sojae*, foi incluída no grupo V.

No âmbito da taxonomia tradicional, os caracteres morfológicos foram principalmente utilizados para classificar as espécies de *Phytophthora*, baseados nas dimensões e formas de esporângios, anterídios, clamidósporos, oósporos e oogônios que os separam em grupos morfológicos (WATERHOUSE, 1963). Porém, tal classificação não é considerada precisa, visto a existência de muitas espécies similares morfológicamente, além da atipicidade de alguns isolados dentro de uma mesma espécie e dificuldade do microrganismo em produzir estruturas reprodutivas em meio artificial. Esses critérios são recomendados para utilização como auxílio, parâmetro ou dados para uma integração morfológica/molecular na identificação e/ou caracterização de uma espécie nestes grupos (ABAD, 2008).

A técnica de PCR, dentre outras utilizações, oferece inúmeras vantagens no diagnóstico de doenças quando comparada aos métodos tradicionais, possui sensibilidade de detecção além de ser preciso. Os ensaios moleculares de PCR surgem como ferramentas para a detecção e diagnose de *P. sojae*, Bienapfl, Malvick e Percich (2011) desenvolveram primers específicos para região ITS do rDNA do genoma do patógeno para PCR-real time e PCR convencional, obtendo resultados satisfatórios para ambos os tipos de reações e são considerados espécie-específicos. Bordon (2013) relata a segurança do uso diagnóstico dos primers testados em seu trabalho, bem como a distinção da espécie em relação as outras espécies do gênero.

#### **2.4 Associação de *Phytophthora sojae* com sementes e outras partes das plantas de soja**

Considerada um dos principais insumos da agricultura moderna, a semente, além de veículo de reprodução das plantas, é determinante do sucesso ou insucesso de uma cultura, porque sua qualidade reflete, significativamente, na produção final do cultivo (GUIMARÃES, 2016). A semente difere do grão comercial pela forma de produção na prática, tratando-se de um processo que exige um amplo e rigoroso sistema de controle interno de qualidade por parte de seus produtores, além do cumprimento de leis e normas estabelecidas por Órgãos oficiais fiscalizadores como Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (ABRASEM, 2019).

A condição sanitária de sementes é extremamente importante para a produção de



plantas de alta qualidade, o que leva ao entendimento de que o conhecimento sobre a natureza da associação desses microrganismos patogênicos com as sementes é, portanto, de fundamental importância para o sucesso de qualquer sistema agrícola (GUIMARÃES, 2016). O aprimoramento de métodos diagnósticos de patógenos em sementes é ainda um desafio que os programas de controle de qualidade enfrentam em todo o mundo (MACHADO; MACHADO, 2002).

A frequente circulação e introdução de patógenos pelas sementes em áreas de produção tende a aumentar a incidência de doenças já existentes numa área e isto justifica a preocupação de se entender com maior clareza as implicações que decorrem a partir deste tipo de associação biológica. Este conhecimento é de extrema importância para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de manejo da doença.

Os danos causados pela associação de patógenos com sementes englobam uma série de implicações que podem levar a danos intoleráveis, devido ao fato das sementes serem meios potenciais de transmissão de vários patógenos (PEREIRA et al., 2015). Isso mostra a importância da sanidade de sementes, uma vez que 90% das espécies destinadas à produção de alimentos no mundo são propagadas por sementes e essas plantas estão sujeitas ao ataque de doenças, sendo a maioria desse patógenos transmitidos por sementes (GUIMARÃES, 2016). Um aspecto importante que se tem notado é que as relações entre as sementes e os agentes fitopatogênicos são abordadas de maneira mais genérica, com pouco detalhamento que o assunto merece.

Apesar da escassez de informações sobre transmissão e a disseminação da *Phytophthora* por sementes de soja (SCHMITTHENNER, 2015), percebe-se que há registros de presença do patógeno em sementes deste hospedeiro (JIN et al., 1999). Nestes trabalhos não ficou evidenciado a transmissão do patógeno a partir de sementes colhidas e secas, deixando o questionamento se o oomiceto mantém-se viável nas sementes nestas condições de pós- colheita.

Em relatos de literatura para outras espécies de *Phytophthora* que já foram detectados em sementes de seus hospedeiros como nos casos de *Phytophthora* em sementes de seringueira, cucurbitáceas, batata (PEREIRA et al., 2004; URBEN et al, 1982; GODOY et al., 2016; RICHARDSON, 1979) contudo não se tem evidências ou comprovações concretas de transmissão dessas espécies de sementes às plantas emergidas.

Segundo trabalhos realizados nos EUA a população de *P. sojae* vem apresentando uma grande diversidade de indivíduos e isto surge como um sério desafio para o seu manejo (GIESLER; BRODERICK, 2016). No Brasil este tipo de investigação ainda não tem sido

colocado em prática, mas em razão do crescente aumento de constatações de ocorrência da doença em diversas áreas produtoras de soja no país, presume-se que o mesmo cenário descritos nos EUA já esteja ocorrendo no Brasil.

Do ponto de vista de manejo, o conhecimento mais aprofundado do processo de transmissão de patógenos por sementes, constitui para a agricultura moderna, uma necessidade imprescindível com vistas ao controle das doenças que estes patógenos causam (MACHADO; POZZA, 2005).

## **2.5 Tratamento sanitário de sementes de soja no controle de *Phytophthora sojae***

O tratamento de sementes é uma das medidas fitossanitárias mais eficientes nas lavouras de soja, ajudando a eliminar ou reduzir a pressão de doenças em sementes e plântulas, como também por impedir a entrada e circulação do patógeno em áreas isentas (BASF, 2018).

A resistência genética é o método de controle mais eficiente para o caso da podridão-radicular em soja atuando tanto de forma raça-específica (completa) como parcial (limitando o dano ao tecido radicular) (WERNER, 2020). No entanto a eficácia do método genético pode ser comprometida com o passar do tempo pelas mudanças que podem ocorrer na população do patógeno com o surgimento de novas raças, o que faz com que outras medidas, como controle químico sejam aplicadas em complemento. O uso de fungicidas ou oomicidas (nomenclatura pouco utilizada) através do tratamento de sementes e práticas de manejo de solo são outras formas efetivas de evitar ou controlar a população de *P. sojae*.

Os princípios ativos de produtos químicos mais eficazes existentes para controle de doenças causadas por espécies de *Phytophthora* são Metalaxil e Mefenoxam, da classe fenilamidas, que atuam em média, por duas a três semanas. A eficácia destes princípios ativos já tem sido comprovada através de inúmeros trabalhos com produtos comerciais formulados já disponíveis no mercado (COSTAMILAN et al., 2007; RADMER et al., 2017; SYNGENTA, 2017; COSTA et al., 2018).

Alguns destes trabalhos indicam que o controle da doença em condições muito favoráveis a doença é eficaz somente por meio do uso de doses mais elevadas de Metalaxil. Um outro princípio ativo mais recente no mercado, Oxathiapiprolin, tem se mostrado extremamente ativo contra oomicetos patogênicos a diversos hospedeiros vegetais, exceto *Pythium* (COHEN, 2015), sendo altamente eficaz quando aplicado em folhas, no sistema

radicular, em sementes ou no solo (COHEN, 2019; COHEN, 2020).

De maneira geral, o tratamento de sementes constitui-se na atualidade uma das mais poderosas medidas de controle de doenças em soja, sejam estas doenças associadas direta e indiretamente às sementes nesta cultura (RADMER et al., 2017).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local e realização dos ensaios**

Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Patologia de Sementes (LAPS) do Departamento de Fitopatologia na Universidade Federal de Lavras (UFLA), sendo realizados em laboratório e em casa de vegetação.

#### **3.2 Obtenção e multiplicação de *P. sojae***

Foi utilizado um isolado de *P. sojae*, cedido pelo Instituto Biológico de Campinas com código de registro no Laboratório de Patologia como LAPS826. Inicialmente o isolado, proveniente de cultura pura, foi transferido para placas de Petri de 9 cm, contendo meio de extrato de tomate acrescido de sacarose. As placas contendo o oomiceto foram transferidas e mantidas em câmara do tipo BOD à temperatura de 25°C ±2 e fotoperíodo de 12 horas por 10 dias.

#### **3.3 Avaliação da transmissibilidade do patógeno de plantas às sementes em condições controladas**

Para os estudos de transmissibilidade de *P. sojae* de plantas com vagens inoculadas para sementes foi utilizada a cultivar IPRO97R50 (Cultivar 1), cuja natureza precisa de comportamento varietal a *P. sojae* não foi disponibilizada pela empresa fornecedora das sementes. O perfil de qualidade foi determinado por métodos descritos nas Regras para Análise de Sementes (2009) e expressos na Tabela 1 junto com as outras cultivares que foram utilizadas em testes no laboratório.

Tabela 1 – Perfil de germinação e qualidade sanitária das cultivares de soja utilizadas nestes estudos.

Cultivar	Germinação (%)	Sanidade (Incidência de fungos) (%)			
		<i>Cercospora kikuchii</i>	<i>Fusarium pallidoroseum</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.
Cultivar 1 <sup>1</sup>	95	0,5	0,5	0	1,0
Cultivar 2 <sup>2</sup>	95	0	0,5	2,0	1,0
Cultivar 3 <sup>3</sup>	96	0	0,5	2,0	1,0

<sup>1</sup>IPRO97R50, <sup>2</sup>IPRO97Y91, <sup>3</sup>DM75176 RSF IPRO

Para o estudo de transmissão de *P. sojae* de planta para sementes, efetuou-se o cultivo a partir de sementes em vasos com capacidade de 10 L, contendo mistura de substrato agrícola (Topstrato®), areia e terra, na proporção de 1:1:1 (v:v:v), autoclavados e mantidos em casa de vegetação, com temperaturas de 28 °C ± 3 °C. Em cada vaso foram distribuídas 6 sementes e, antes da inoculação, realizado um desbaste deixando-se 4 plantas por vaso.

As inoculações do patógeno foram realizadas em dois estádios de desenvolvimento reprodutivo da soja, R5 e R6, nos meses de Abril e Maio, conforme esquema fenológico apresentado em seguida (Figura 1).

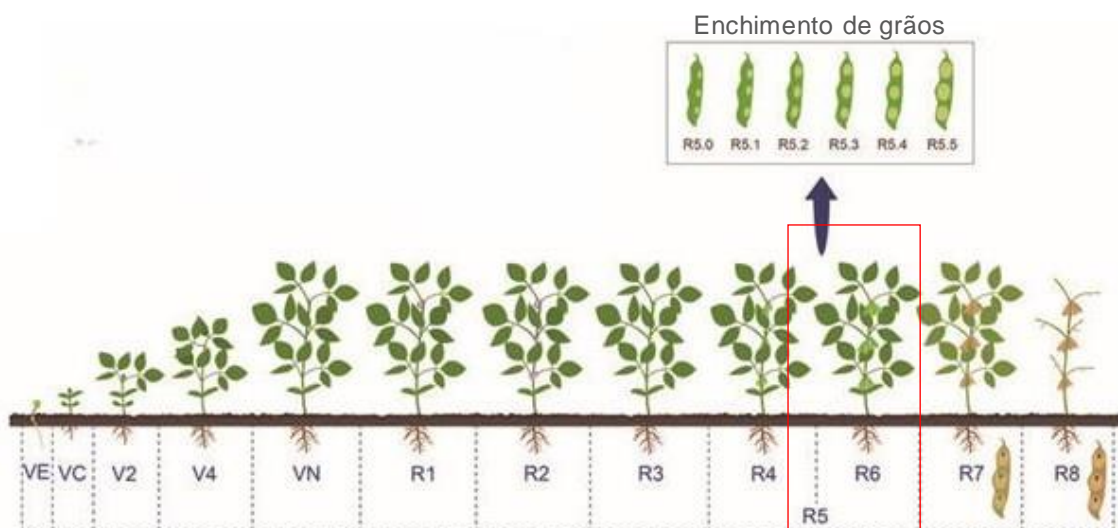


Figura 1: Esquema de estádios fenológicos da soja.

O inóculo foi constituído de suspensão de fragmentos miceliais, obtidos de colônias desenvolvidas em meio de cultura de extrato de tomate, acrescido com sacarose 1 g e ágar. A suspensão do patógeno foi preparada por meio de raspagens superficiais das colônias desenvolvidas em meio agarizado contido em 5 placas de Petri (9 cm de diâmetro), com auxílio de pincel de cerdas macias com transferência do material para frasco de vidro, capacidade de 50 ml, contendo 40 ml de água esterilizada. Para o segundo tipo de inoculação foram utilizados fragmentos de colônia do patógeno, dimensão de 1 cm<sup>2</sup>, retirados das margens do crescimento em placas de 9 cm contendo meio agarizado de extrato de tomate acrescido de sacarose. Os tipos de inoculação são representados no esquema seguinte (Figura 2).

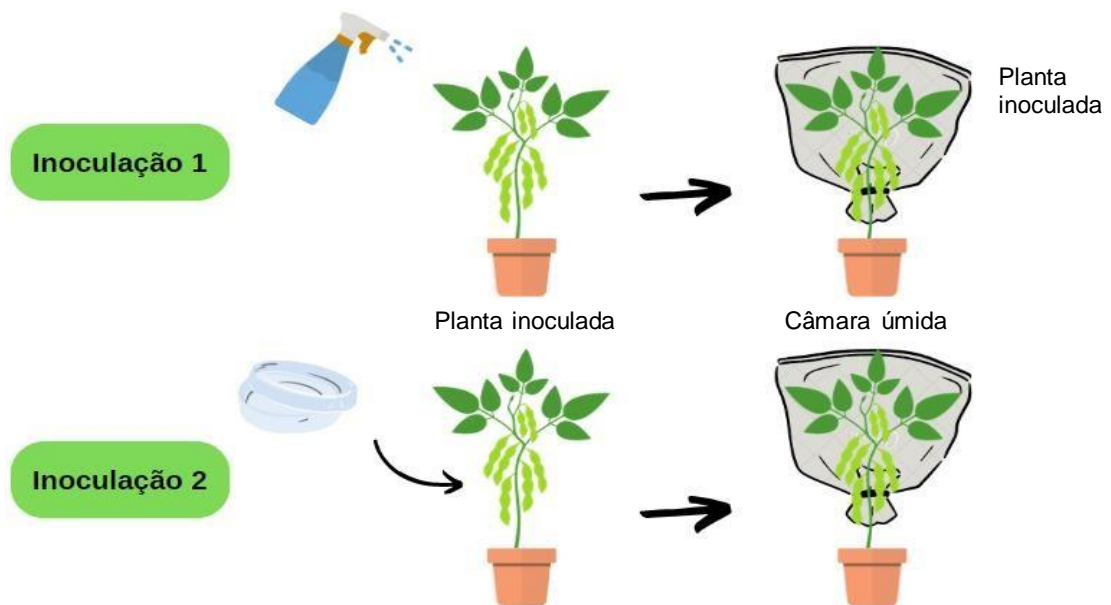


Figura 2: Tipos de inoculação, inoculação 1 por aspersão e inoculação 2 por contato direto do patógeno com a vagem.

A aplicação do inóculo, em suspensão, foi realizada por meio de pulverizações com auxílio de borrifador comercial de uso doméstico (estilo spray) sendo direcionados  $\pm 15$  mL de suspensão por vaso contendo as plantas com as vagens nos 2 estádios reprodutivos da soja. O segundo tipo de inoculação foi feito por contato direto dos fragmentos do meio contendo estruturas do patógeno em plantas nos estádios, já mencionados, de cada vaso. Os tecidos das vagens foram previamente injuriados com perfurações superficiais nas vagens utilizando-se alfinetes devidamente desinfestados e em seguida realizadas as inoculações.

Logo após as aplicações do inóculo, as plantas foram colocadas em câmara úmida por meio de cobertura dos vasos com sacos de polietileno transparentes e desinfestados pelo período de 72 horas. O mesmo número de plantas desenvolvidas em vasos utilizados para a inoculação de *P. sojae* foi utilizado para aplicação de água destilada sem inóculo e por contato com meio de cultura sem o patógeno, equivalendo estes às testemunhas experimentais.

Todas as plantas, inoculadas e não inoculadas (testemunha), cobertas com sacos de polietileno foram regadas a intervalos regulares e mantidas, sem molhamento foliar, em casa de vegetação pelo período correspondente ao ciclo produtivo da soja.

A colheita foi realizada com base na umidade de maturação fisiológica das sementes, procedendo-se em seguida a secagem em ambiente de laboratório até umidade final de 11%. Após a colheita, as sementes ficaram acondicionadas em sacos de papel e mantidas em câmaras de armazenamento com temperatura de  $\pm 10^{\circ}\text{C}$  e 50% UR.

### **3.3.1 Avaliações da ocorrência de *P. sojae* e germinação das sementes colhidas**

#### **3.3.1.1 Teste de sanidade**

As sementes foram analisadas pelo teste de blotter, sendo utilizadas 30 sementes, divididas em 2 repetições, as quais estavam dispostas individualmente sobre camadas de 3 discos de papel de filtro sobrepostos e umedecidos com ágar-água acrescidos de 2,4-D (diclorofenoxiacetato de sódio), concentração de 10ppm, e suco de tomate na concentração de 40 ml/L, mantendo-se as sementes distanciadas 1-2 cm uma das outras, no interior de placas de Petri de 15 cm de diâmetro. As placas foram mantidas em câmara do tipo BOD com temperatura de 25 °C, fotoperíodo de 12 horas diárias por 7 dias. Em seguida, as sementes foram examinadas individualmente em microscópio estereoscópico e microscópio óptico.

#### **3.3.1.2 Teste de germinação**

Este teste foi aplicado para verificação da germinação de sementes colhidas de plantas inoculadas e não inoculadas. O teste foi conduzido por meio do método do rolo de papel, sendo utilizadas 40 sementes distribuídas em 2 repetições de 20 sementes, com incubação em germinador sob temperatura de 25 °C. As avaliações foram feitas no sétimo dia, seguindo critérios estabelecidos pela RAS (BRASIL, 2009).

### **3.4 Avaliação de efeitos e viabilidade de *P. sojae* em sementes inoculadas**

Para avaliar a viabilidade de *P. sojae* e efeitos do patógeno em sementes empregou-se o procedimento de inoculação artificial das sementes pela técnica de condicionamento hídrico, desenvolvida e aperfeiçoada na Universidade Federal de Lavras (MACHADO et.al., 2001; COSTA et.al., 2003; MACHADO et.al., 2011) e já descrita para outros patossistemas. Neste teste as sementes foram submetidas ao contato direto com as colônias de *Phytophthora sojae* desenvolvidas em meio de cultura modificado com ágar e acrescido com 40 ml de extrato de tomate, 1g de sacarose e 70 g de manitol com potencial osmótico de -1,0 Mpa (utilizado para soja) pelos períodos de 48 e 96 horas, equivalentes a dois níveis de inóculo (NI) do patógeno.

Foram utilizadas sementes de três cultivares de soja (IPRO97R50 - Cultivar 1; IPRO97Y91 - Cultivar 2; DM75176 RSF IPRO - Cultivar 3), cujos perfis fisiológicos e sanitários foram apresentados na Tabela 1 (Item 3.3) e o isolado de *P. sojae* LAPS826. De cada cultivar foram utilizadas  $\pm 50$  g (aproximadamente 310 sementes) de sementes/placa, distribuídas em placas de Petri de 15 cm de diâmetro e 5 repetições, todas as sementes das 3 cultivares foram desinfestadas por meio de imersão em hipoclorito de sódio, 1%, por 1 minuto e depois submetidas a três lavagens sucessivas com água destilada e autoclavada, em seguida foram colocadas para secar em ambiente de laboratório. As avaliações foram realizadas por meio dos seguintes testes:

#### **3.4.1 Teste de sanidade das sementes**

As análises foram realizadas por meio do “blotter test” descrito nas RAS (BRASIL, 2009) modificado em meio de cultura com extrato de tomate e sacarose. Foram utilizadas 50 sementes, sendo elas divididas em 4 repetições. Em seguida, as sementes foram examinadas individualmente em microscópio estereoscópico com uso de microscópio ótico em caso de necessidade. Os resultados observados foram expressos em sementes com ou sem presença de *P. sojae*.

#### **3.4.2 Teste de germinação**

Para este teste utilizou-se o método do rolo de papel. O teste foi conduzido com 200 sementes distribuídas em 4 repetições de 50 sementes, com incubação em germinador sob



temperatura de 25 ° C. As avaliações foram feitas no sétimo dia, seguindo critérios estabelecidos pela RAS (BRASIL, 2009)

### **3.4.3 Teste de emergência em substrato com areia**

Este teste foi realizado para as sementes inoculadas pela técnica de condicionamento hídrico, sendo conduzido com 4 bandejas de polietileno com dimensões 48 x 29 x 10 cm, equivalentes a 4 repetições, contendo cada bandeja 25 copos plásticos, capacidade de 200 ml, perfazendo um total de 100 sementes por tratamento. O substrato comercial (Topstrato®), foi misturado com areia na proporção (v:v) 1:1 e em seguida colocado nos copos plásticos e dispostos nas bandejas que foram mantidas em câmara de cultivo vegetal com temperatura de 25 °C.

O estande inicial foi avaliado no 5º dia após a semeadura, sendo considerada plantas emergidas as que apresentaram os cotilédones acima do nível do solo, e o estande final avaliado no 18º dia após a semeadura. O Índice de velocidade de emergência (IVE) foi avaliado por meio de contagens diárias de emergência de plantas até a estabilização do estande, sendo os valores calculados conforme descrição em literatura para esta variável (MAGUIRE, 1962). A avaliação de peso de plantas frescas e secas e altura foi realizada ao final do teste, 20 dias após a semeadura, considerando se a parte aérea de plantas emergidas e com a secagem realizada em estufa com fluxo de ar à uma temperatura de 60°C.

Plantas mortas em pós-emergência, plantas emergidas com sintomas típicos e plantas emergidas assintomáticas foram avaliadas ao final do 18º dia de cultivo. A presença e viabilidade do patógeno nos tecidos examinados foram avaliadas por meio de isolamento convencional do patógeno por meio de incubação dos fragmentos em meio agarizado contendo suco de tomate e exame de confirmação do patógeno com auxílio de microscopia ótica.

### **3.4.4 Avaliação da viabilidade de *P. sojae* em sementes de soja armazenadas**

As sementes inoculadas e não inoculadas pela técnica já descrita no item 3.5 foram então separadas em sacos de papel e utilizadas para o ensaio de viabilidade do patógeno em armazenamento.

As sementes de ambos níveis de inoculo e as suas testemunhas foram divididas em ambiente de câmara de armazenamento a  $\pm 10^{\circ}\text{C}$  e 50% UR e ambiente de bancada em

laboratório. O período de armazenamento para o estudo da viabilidade foi definido em 4 meses com avaliações da ocorrência de viabilidade do patógeno a cada 30 dias. Foram realizados testes de sanidade conforme descrito no item 3.4.1 e teste de germinação conforme descrição no item 3.4.2.

### **3.5 Avaliação da sensibilidade de *P. sojae* a alguns fungicidas em fase de experimentação para tratamento de sementes de soja in vitro**

Para este estudo foram utilizados os produtos Maxim Advanced® ((Metalaxil-M (20 g L<sup>-1</sup> i.a) + Tiabendazol (150 g L<sup>-1</sup> i.a) + Fludioxonil (25 g L<sup>-1</sup> i.a)), Apron RFC® ((Fludioxonil(25 g L<sup>-1</sup> i.a) + Metalaxil-M (37 g L<sup>-1</sup> i.a)) já registrados e comercializados no Brasil para controle de espécies de Oomycetes e um produto em fase experimental no Brasil, composto pelos ingredientes ativos: Ipconazole, Picoxystrobina e Oxathiapiprolin, denominado de PIO neste trabalho. Para esta mistura, as avaliações estenderam-se também aos ingredientes ativos em separado.

Os produtos, em mistura ou isolados no caso do PIO, foram incorporados ao meio de cultura V8 agarizado seguindo-se protocolos existentes para este tipo de avaliação e em seguida submetidos a autoclavagem convencional. Para cada tratamento constituído pelos produtos em mistura ou isolados foram utilizadas as concentrações: 0, 5, 10, 25, 50, 100, 250 e 500 ug.mL<sup>-1</sup>. Posteriormente o meio foi distribuído em placas de Petri de 9 cm e os discos de inóculo, diâmetro de 0,5 cm, contendo micélio de *P. sojae*. foram colocados no centro de cada placa.

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado 1 x 8 (isolado de *P. sojae* x concentrações), com 5 repetições, sendo cada placa de Petri considerada uma unidade experimental. Em seguida a montagem do experimento, as placas foram vedadas e incubadas em câmara tipo B.O.D., à temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Os diâmetros das colônias foram medidos diariamente em dois sentidos ortogonais até o sétimo dia de incubação com o auxílio de paquímetro. O período final das medições para cada tratamento foi determinado tendo se como referência o diâmetro anterior da colônia antes de atingir o limite da placa de Petri. A avaliação visual das colônias em desenvolvimento também foi realizada, observando se aspectos morfológicos do organismo.

Posteriormente, por diferenças entre os diâmetros registrados diariamente, procedeu-se ao registro dos valores correspondentes a área de inibição diária do crescimento micelial por produto em teste.

Os dados coletados foram utilizados para o cálculo do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) por meio da fórmula (OLIVEIRA,1991):

$$IVCM = \Sigma (D - D_a) / N$$

D= diâmetro médio atual da colônia

D<sub>a</sub>= diâmetro médio do dia anterior

N= número de dias de incubação

As porcentagens de inibição do crescimento micelial (PICM), foram calculadas por meio da fórmula (EDGINGTON, 1971):

$$PICM = (DT - DTR / DT) \times 100$$

DT= Diâmetro da testemunha

DTR= Diâmetro do tratamento

### **3.6 Análise estatística**

Os experimentos em câmara de crescimento foram realizados no delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), 4 tratamentos, 1 isolado, 3 cultivares com 4 repetições, as análises foram submetidas ao teste ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) e em seguida submetidos ao teste de Scott-Knott ( $\alpha = 0,05$ ) sendo analisados os níveis de inóculo por cultivar. No experimento in vitro, as variáveis IVCM e PICM foram comparados pelo teste F da ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ). Todas as análises foram realizadas utilizando o pacote ExpDes.pt do software estatístico RStudio (FERREIRA et al., 2014).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Transmissibilidade de *Phytophthora sojae* de plantas as sementes de soja

Pelos métodos e condições de inoculação utilizados neste trabalho observou-se que *P. sojae* não foi capaz de infectar as vagens de soja nos estádios de reprodutivos da cultura, Figura 3.

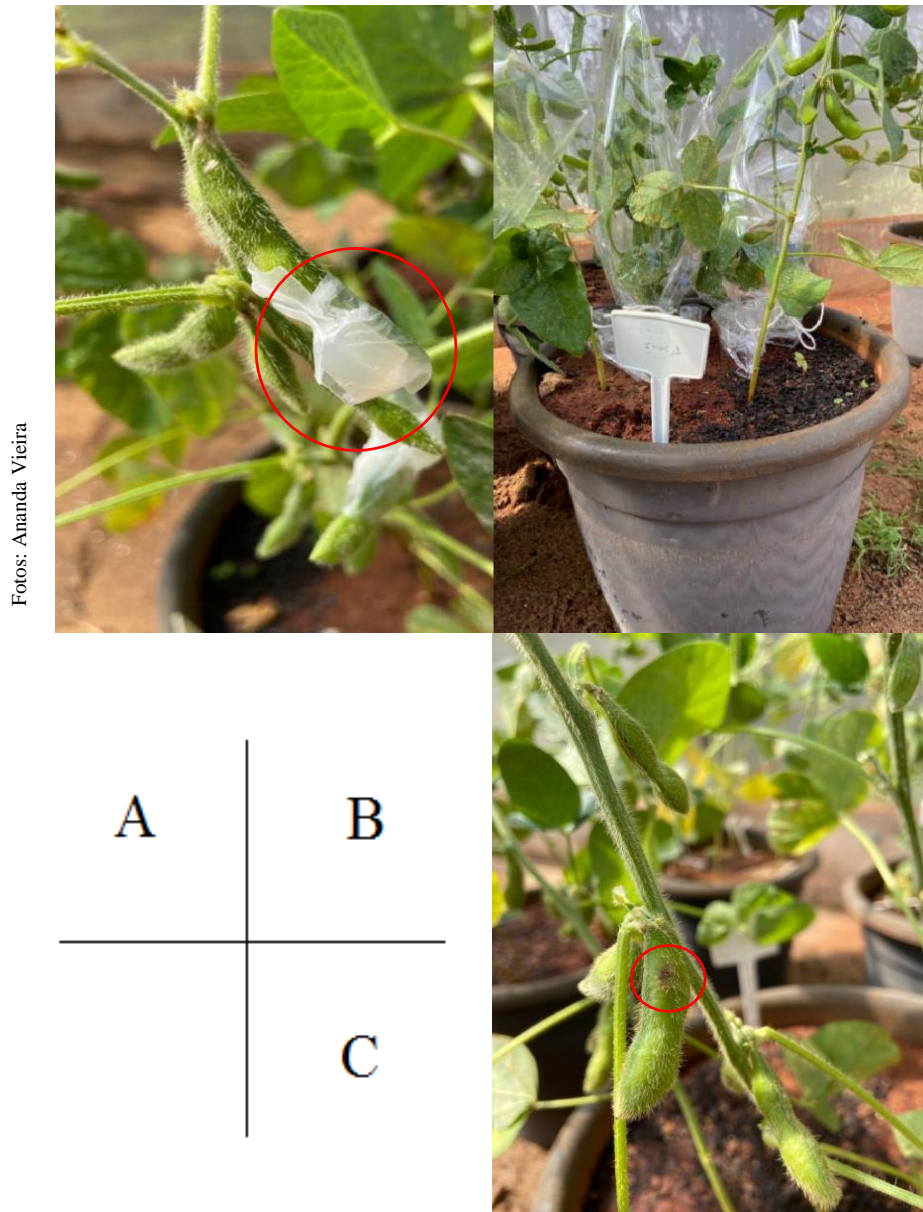


Figura 3: Plantas de soja em casa de vegetação: com vagens inoculadas (A), submetidas a câmaras úmidas preparadas com sacos de polietileno (B) e vagem exibindo mancha necrótica restrita ao ponto de ferimento realizado antes da inoculação com *P. sojae* (C).

Pelos exames das sementes colhidas destas plantas, realizados através do método biológico (blotter test com modificado) não houve detecção do patógeno. As lesões na forma de manchas necróticas amarronzadas nas vagens inoculadas foram restritas ao redor dos pontos de ferimentos previamente realizados momentos antes da inoculação do patógeno. Vagens da testemunha apresentaram os mesmos sintomas de lesões necróticas. Estes resultados divergem de trabalhos anteriores de Jin e Zhaohui (1999), que encontraram inóculo do referido organismo em sementes de soja.

Pelo teste de germinação conduzido para as sementes de plantas que foram inoculadas, não se observou diferenças entre os tratamentos, incluindo a testemunha. Estes resultados confirmam de certa forma a ausência de agressividade do patógeno nas vagens inoculadas, das quais foram extraídas as sementes para estas análises em laboratório.

Entende-se que a transmissão de patógenos de plantas a sementes é um processo que depende de inúmeros fatores bióticos e abióticos. O uso de diferentes materiais como cultivares de soja, isolado do patógeno, condições de cultivo da soja entre outros fatores pode explicar a divergência de resultados nestes estudos. Especificamente neste trabalho, a natureza genética do hospedeiro e do patógeno, aliado as condições de temperatura do cultivo em casa de vegetação, podem não ter sido favoráveis para o acesso e parasitismo do patógeno colocado em contato com as vagens em diferentes estágios reprodutivos das plantas.

Vale salientar que informações apresentadas no trabalho de Jin e Zhaohui (1999), não esclarecem as condições e outros fatores de execução do estudo realizado. Com base nos resultados destes estudos fica evidente que investigações mais aprofundadas tornam se necessárias para conclusões mais seguras sobre a natureza real das relações patógeno-hospedeiro no presente caso. Importante salientar que neste tipo de estudo é preciso reproduzir com rigor as condições que predominam nas regiões de cultivo da soja onde a podridão de fitoftóra tem sido registrada com severidade.

#### **4.2 Avaliação de efeitos e viabilidade a partir de sementes inoculadas com *P. sojae* in vitro**

Os resultados referentes as avaliações de germinação das sementes inoculadas e não inoculadas com *P. sojae*, analisadas segundo descrição das RAS (MAPA, 2009), expressos em percentuais, estão na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores percentuais de germinação das cultivares de soja inoculadas em ensaio de transmissão de *P. sojae* de sementes a plantas em condições de cultivo controlado.

<b>Tratamentos</b>	<b>Cultivar 1 (%)</b>	<b>Cultivar 2 (%)</b>	<b>Cultivar 3 (%)</b>
<b>NI<sup>1</sup> 48 H</b>	94	94	95
<b>NI 96 H</b>	94	94	95
<b>NI 0</b>	96	95	95
<b>NI 0 + MANITOL 48 H</b>	96	94	95
<b>NI 0 + MANITOL 96 H</b>	96	95	95

<sup>1</sup>Nível de inóculo

O fato de não se ter detectado diferenças estatísticas entre os tratamentos nestas avaliações de germinação das sementes em laboratório, indica que o patógeno não foi capaz de interferir nesta variável nestas condições. Embora o patógeno tenha sido detectado nas sementes inoculadas, percebe-se que não houve uma relação entre os percentuais de germinação das sementes e os níveis de inóculo utilizados neste estudo.

Pelo teste de sanidade, blotter test, observou-se a presença de estruturas de *P. sojae* nos níveis de inóculo do patógeno com incidências médias relativamente elevadas conforme indicadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores percentuais da incidência média de *P. sojae* em sementes de cultivares de soja inoculadas e não inoculadas em laboratório.

<b>Tratamentos</b>	<b>Cultivar 1</b>	<b>Cultivar 2</b>	<b>Cultivar 3</b>
<b>NI<sup>1</sup> 48 H</b>	70 %	69%	69%
<b>NI 96 H</b>	69%	69%	70%

<sup>1</sup>Nível de inóculo

Pelas condições do teste de blotter aplicado neste estudo para a detecção de *P. sojae* nas sementes inoculadas, foi possível observar a formação de oósporos (Figura 4) pelo patógeno conforme ilustrado na Tabela 3. A adaptação do substrato deste teste com incorporação de meio modificado, conforme descrito em Material e Métodos, foi certamente fundamental para o desenvolvimento de *P. sojae* e para a formação de oósporos.

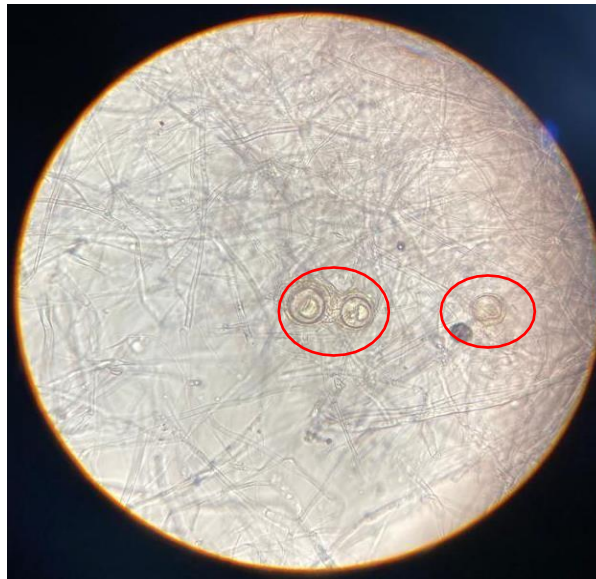


Figura 4: Oósporos formados em colônias de *P. sojae* desenvolvidas nas condições do blotter test.

Pelo teste de emergência, conduzido em condições controladas de câmara de cultivo vegetal, observou-se que *P. sojae* foi capaz de provocar reduções significativas em todas as variáveis utilizadas para avaliar os efeitos do patógeno no desempenho das sementes de soja. As reduções detectadas nas variáveis analisadas, estande inicial e estande final, vigor das plantas representado por IVE, pesos de matéria fresca e matéria seca e a altura das plantas emergidas variaram em intensidade tanto entre cultivares como entre níveis de inóculo utilizados neste estudo (Tabelas 4, 5, 6 e 7).

Nota-se que o patógeno causou efeito sobre o estande inicial especialmente logo após a inoculação, com reduções de 76, 74 % e 74% para as três cultivares utilizadas em comparação com a germinação das testemunhas. Na literatura encontram-se informações de inúmeros trabalhos que relatam essa interferência de patógenos em relação a germinação, como nos casos de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum truncatum* em soja, *Stenocarpella maydis*, *Exsoerohilum turcicum* em milho, entre outros (BOTELHO, 2011; BARROCAS, 2008; GUIMARÃES, 2016).

Pelos resultados do teste de emergência observou-se que os valores de estande inicial variaram significativamente entre níveis de inóculo em relação a testemunha de cada cultivar (tabela 4). As reduções medias entre os níveis de inóculo comparados com a testemunha foram de 66% na cultivar 1, de 66% na cultivar 2 e de 64% na cultivar 3.

Em relação a estande final, nota-se que houve uma redução nos tratamentos referentes

aos dois níveis de inóculo, em todos os cultivares, em comparação com a testemunha. Isto sugere que a presença de *P. sojae* nas sementes provoca um atraso inicial na emergência de plantas quando comparados com sementes livres do patógeno. Esta hipótese pode ser comprovada pela avaliação do índice de velocidade de emergência cujos resultados estão expressos na Tabela 5. O estande final apresentou uma redução bem maior quando comparado com a testemunha havendo diferença estatística entre eles (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores de estande inicial e final das plantas de soja inoculadas (NI) e não inoculadas com *P. sojae* e avaliadas em câmara de cultivo vegetal.

<b>Cultivar</b>	<b>Nível de inóculo</b>	<b>Estande inicial (n° de plantas)</b>	<b>Estande final (n° de plantas)</b>
	<b>NI<sup>1</sup> 48</b>	3,50 b <sup>2</sup>	8,50 b
<b>Cultivar 1</b>	<b>NI 96</b>	3,75 b	10,00 b
	<b>NI 0<sup>3</sup></b>	22,50 a	25,00 a
	<b>NI 48</b>	3,25 b	8,50 b
<b>Cultivar 2</b>	<b>NI 96</b>	3,75 b	10,25 b
	<b>NI 0</b>	24,50 a	25,00 a
	<b>NI 48</b>	4,50 b	9,00 b
<b>Cultivar 3</b>	<b>NI 96</b>	3,25 b	11,25 b
	<b>NI 0</b>	23,25 a	25,00 a

<sup>1</sup>Nível de inóculo

<sup>2</sup>As médias seguidas pela mesma letra na coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Scott-Knott a  $p \leq 0,005$ .

<sup>3</sup>NI 0 equivalente a Testemunha.

Em relação ao índice de velocidade de emergência (IVE) foi possível observar um efeito significativo do patógeno no vigor das plantas oriundas de sementes inoculadas. Em ambos potenciais ou níveis de inóculo a redução média de IVE foi da ordem de 60% em relação a testemunha (tabela 5). No confronto destes resultados com os de estandes (Tabela 4), percebe-se que a presença do patógeno nas sementes é um fator para o atraso no processo de germinação das sementes.



De modo geral, estes resultados seguem a mesma tendência dos resultados de trabalhos conduzidos com outros patossistemas conforme relatados em literatura (SOUSA, 2006; ARAÚJO, 2008; BARROCAS, 2008; BARROS, 2019), ou seja o patógeno afeta a qualidade da sementes após a inoculação sendo demonstrado em partes pelo IVE e pelos valores do estande inicial e final.

Tabela 5 - Valores do Índice de velocidade de emergência (IVE) das plantas de soja inoculadas e não inoculadas com *P. sojae* e avaliadas em câmara de cultivo vegetal.

<b>Cultivar</b>	<b>Nível de inóculo</b>	<b>IVE</b>
	<b>NI<sup>1</sup> 48</b>	1,14 b
<b>Cultivar 1</b>	<b>NI 96</b>	1,27 b
	<b>NI 0<sup>3</sup></b>	4,70 a
	<b>NI 48</b>	1,37 b
<b>Cultivar 2</b>	<b>NI 96</b>	1,65 b
	<b>NI 0</b>	5,00 a
	<b>NI 48</b>	1,49 b
<b>Cultivar 3</b>	<b>NI 96</b>	1,75 b
	<b>NI 0</b>	4,87 a

<sup>1</sup>Nível de inóculo

<sup>2</sup>As médias seguidas pela mesma letra na coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Scott- Knott a  $p \leq 0,005$ .

<sup>3</sup>NI 0 equivalente a Testemunha.

Os valores de pesos de matéria fresca e seca de plantas oriundas de sementes inoculadas também tiveram diferença entre os níveis de inóculo, demonstrando que o patógeno afeta diferentes variáveis em relação a planta (Tabela 6). Apenas a Cultivar 3 apresentou diferença estatística entre os níveis de inóculo e a testemunha e a Cultivar 1 NI 48 não apresentou diferença estatística na matéria seca.

Tabela 6 - Valores do Peso da matéria fresca e seca das plantas de soja inoculadas e não inoculadas com *P. sojae* e avaliadas em câmara de cultivo.

<b>Cultivar</b>	<b>Nível de inóculo</b>	<b>Peso matéria fresca (gramas)</b>	<b>Peso matéria seca (gramas)</b>
	<b>NI<sup>1</sup> 48</b>	25,75a <sup>2</sup>	16,70 b
<b>Cultivar 1</b>	<b>NI 96</b>	15,60 b	11,50 b
	<b>NI 0<sup>3</sup></b>	30,00 a	19,62 b
<b>Cultivar 2</b>	<b>NI 48</b>	13,77 b	10,00 b
	<b>NI 96</b>	10,95 b	12,60 b
	<b>NI 0</b>	28,07 a	20,00 a
<b>Cultivar 3</b>	<b>NI 48</b>	20,00 b	12,90 b
	<b>NI 96</b>	12,92 b	9,75 c
	<b>NI 0</b>	34,00 a	15,50 a

<sup>1</sup>Nível de inóculo

<sup>2</sup>As médias seguidas pela mesma letra na coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Scott- Knott a  $p \leq 0,005$ .

<sup>3</sup>NI 0 equivalente a Testemunha.

A altura se manteve com dimensões próximas entre os tratamentos em relação a testemunha, não havendo portanto possibilidade de diferenciação visual desta variável entre os tratamentos, exceto na Cultivar 2 que apresentou plantas menores oriundas de inoculação das sementes com o nível de inóculo menor, NI 48. Estes resultados carecem de investigações mais pontuais para conclusões mais seguras (Tabela 7). Pode-se mais uma vez deduzir que o patógeno não coloniza todas as sementes internamente apenas externamente, mesmo sendo estas colocadas e mantidas em contato com a colônia do organismo por períodos relativamente longos como é o caso de 96 horas (4 dias) de incubação.

Tabela 7 - Valores da Altura das plantas de soja e não inoculadas com *P. sojae* e avaliadas em câmara de cultivo vegetal.

<b>Cultivar</b>	<b>Nível de inóculo</b>	<b>Altura (cm)</b>
<b>Cultivar 1</b>	<b>NI 48</b>	33,33 a
	<b>NI 96</b>	31,12 a
	<b>NI 0</b>	34,31 a
<b>Cultivar 2</b>	<b>NI 48</b>	25,48 b
	<b>NI 96</b>	32,78 a
	<b>NI 0</b>	32,63 a
<b>Cultivar 3</b>	<b>NI 48</b>	34,57 a
	<b>NI 96</b>	33,30 a
	<b>NI 0</b>	33,18 a

<sup>1</sup>Nível de inóculo

<sup>2</sup>As médias seguidas pela mesma letra na coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Scott- Knott a  $p \leq 0,005$ .

<sup>3</sup>NI 0 equivalente a Testemunha.

Os resultados deste trabalho revelam que apenas os percentuais de incidência do patógeno observados nos métodos biológicos não são suficientes para indicar o real grau de interação entre *P. sojae* e sementes de soja. A incidência do patógeno em plantas emergidas assintomáticas e sintomáticas e plantas anormais, tanto a parte aérea quanto a parte da raiz, foram isoladas e analisadas em microscópio óptico e lupa como demonstrada na Figura 5. O plaqueamento de partes das plantas sintomáticas e assintomáticas foram dispostas em placas com meio específico para o patógeno, demonstrado na Figura 6.



Foto: Ananda Vieira

Figura 5: Plantas anormais e com sintomas de podridão na região do colo e raízes provenientes de sementes de soja inoculadas com *P. sojae*.

Importante também destacar que a ocorrência de *P. sojae* nas sementes inoculadas comprova de certa forma parte do trabalho de Jin et al. (1999) demonstrando a capacidade do oomiceto de associar-se às semente em condições específicas e transferir-se para a planta proveniente desta semente. Para um organismo considerado hemibiotrófico, e sem mais relatos na literatura sobre sua associação com sementes de soja, esse resultado mostra-se conseqüentemente de grande significado, pois além de comprovar a eficácia da técnica inoculação via condicionamento hídrico no presente caso, demonstra que *P. sojae* é capaz de interagir se com as sementes de soja com posterior transmissão às plantas emergidas.

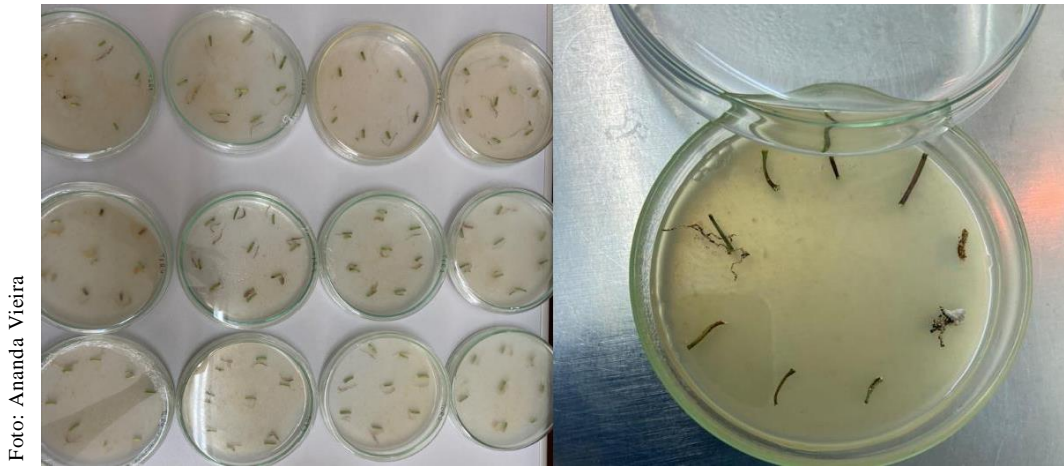


Foto: Ananda Vieira

Figura 6: Plaqueamento em meio agarizado de fragmentos de soja em teste para avaliar presença de *P. sojae* nas plantas oriundas de sementes inoculadas com este patógeno.

Para o estudo de viabilidade de *P. sojae* em condições distintas de armazenamento, observou-se que o patógeno foi detectado nas sementes inoculadas e avaliadas pelo método de blotter modificado no início do período de armazenamento (Época 0), como demonstrado na tabela 8.

O fato de não ter havido detecção do patógeno em sementes inoculadas de todas as cultivares e em ambos os níveis de inóculo aos 30 dias de armazenamento, levanta a hipótese de que o organismo não encontra condições de se manter viável em sementes secas após este período. A análise de fragmentos de plantas resultantes de sementes inoculadas revelou a ausência do patógeno nestes tecidos vegetais.

Tabela 8: Presença (+) ou ausência (-) de *P sojae* em sementes de soja armazenadas em dois ambientes com avaliações mensais.

Níveis de inóculo	Ambiente Armaz.	Epoca 0*	Epoca 1**
NI-0 (Testemunha)	Natural	-	-
	Câmara seca/frio	-	-
NI-48	Natural	+	-
	Câmara seca/frio	+	-
NI-96	Natural	+	-
	Câmara seca/frio	+	-

\* Início de armazenamento; \*\* 30 dias de armazenamento.

Vale ressaltar que outros organismos do Grupo dos Oomycetes caso de espécies de *Peronospora*, *Plamospara*, entre outros podem sobreviver em sementes secas de seus hospedeiros por períodos de até 10 anos (HENNING, 2004). Neste caso, a formação de estruturas de sobrevivência, como oósporos durante a colonização das sementes seja responsável por esta viabilidade prolongada. A ausência destas estruturas neste trabalho com *Phytophthora sojae* neste trabalho nas sementes examinadas pode explicar este comportamento do patógeno durante o armazenamento de sementes secas. Este aspecto requer estudos adicionais, levando se em consideração diversos fatores conforme já referenciados anteriormente para outros aspectos nesta linha de pesquisa.

Uma outra possibilidade que não deve ser descartada neste patossistema é que por tratar-se de um organismo com elevado grau de biotrofismo ela não encontra na própria semente um ambiente favorável para sua manutenção por períodos prolongados e relativamente secos. A existência de uma camada protetora, tegumento, na semente de soja, que é considerado um tecido desprovido de processos vitais, pode constituir-se em uma barreira para a manutenção do patógeno nas sementes inoculadas. A formação de oósporos durante a colonização das sementes pelo patógeno em algumas circunstâncias de ambiente requer atenção em futuros estudos neste âmbito.

Apesar de não ter sido possível detectar a presença de *P. sojae* nos tecidos das

plantas aos 30 dias de armazenamento de sementes inoculadas, a emergência em teste conduzido em câmara de cultivo vegetal foi afetada com reduções de valores de germinação e outras variáveis de desempenho das sementes o que demonstra os reflexos da ação inicial do patógeno por ocasião do contato entre as sementes e as colônias do organismo.

A partir dos resultados destas avaliações compreende-se então que mesmo que o patógeno consiga aderir a semente logo após a inoculação, no período de armazenamento ele perde sua viabilidade sendo este manejo uma forma natural de controle do patógeno, o que nesse caso foi de 30 dias no mínimo, porém permanece ainda a dúvida sobre qual o período o inóculo pode se manter viável até atingir 30 dias no armazenamento.

Do ponto de vista prático este conhecimento constitui um fundamento importante no âmbito de manejo da doença, considerando se que as sementes são utilizadas para plantio alguns meses após o início de seu armazenamento. Nesta condição as sementes se tornam livres da ação do patógeno cujo inóculo inicial tenha sido adquirido pelas sementes antes do início do período de armazenamento.

### 4.3 Avaliação da sensibilidade de *P. sojae* a alguns fungicidas em fase de experimentação para tratamento de sementes de soja *in vitro*

Neste ensaio, de acordo com as análises e gráficos foi possível observar que os tratamentos Oxathiapiprolin e a mistura de Picoxystrobina, Ipconazole e Oxathiapiprolin (PIO) foram os mais eficazes em reduzir o diâmetro de colônias e o Índice de Crescimento micelial de *P. sojae*, não havendo crescimento do patógeno em nenhuma das concentrações destes produtos utilizados neste estudo. Maxim Advanced e Apron, utilizados como padrões, também provocaram inibição total em todas as concentrações utilizadas (Figura 7).

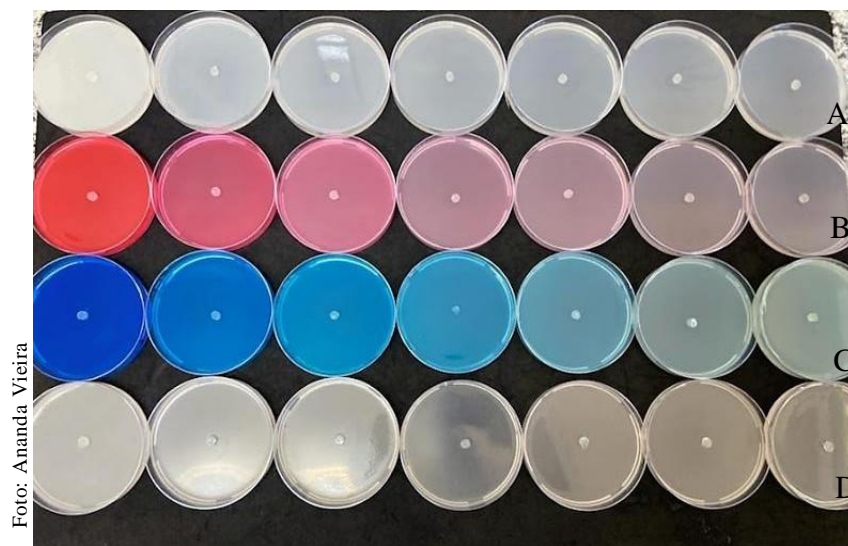


Figura 7: Tratamentos com inibição total em todas as concentrações utilizadas: (A) PIO; (B) Maxim; (C) Apron e (D) Oxathiapiprolin. Da esquerda para direita estão as concentrações dos produtos em ordem decrescentes.

Com base em conhecimentos de outros trabalhos relatados em Literatura, produtos dos grupos triazóis e estrobilurinas não apresentam efeitos pronunciados em relação ao crescimento de membros de Oomicetos, exceto alguns produtos das estrobilurinas. Esta baixa sensibilidade de *P. sojae* aos produtos Ipconazole e Picoxystrobin, conforme demonstrado nas Figuras 8 e 9 já era de certa forma previsível.

O efeito positivo do Metalaxyl no controle da podridão de fitóftora já tem sido observado e relatado por Smith (2020) nos Estados Unidos, em ensaios de seleção de fungicidas para tratamento de sementes. Este ingrediente se mostrou altamente eficaz para o controle de *Phytophthora sojae*, ao contrário dos demais (Tiabendazol e Fludioxonil) que não são recomendados para controle deste patógeno. Dorrance (2018), entre outros



pesquisadores, também comprovou a elevada eficácia de Metalaxil no controle de *P. sojae*. Apesar dos produtos Maxim Advanced e Apron RFC não serem registrados, no Brasil, especificamente para controle de *P. sojae*, ambos por conterem em suas formulações comerciais o ingrediente Metalaxyl, constituem alternativas para uso já consagrado em soja visando ao controle da podridão de fitóftora.

Apron RFC é um produto já registrado oficialmente para controle de espécies de *Pythium* que são membros da mesma família taxonômica de *Phytophthora*. O Metalaxyl-M tem como propriedade penetrar no tegumento da semente e translocar sistemicamente em todas as partes da planta durante a germinação (SYNGENTA, 2017).

Pela literatura observa-se que os resultados de Werner (2020) utilizando Maxim Advanced e Apron RFC diferiram, de certa forma, dos resultados aqui apresentados. Por estes trabalhos a inibição completa do crescimento micelial de *P. sojae* somente ocorreu nas concentrações de 900 ppm (Apron) e 676 ppm (Maxim). Isto revela que o patógeno pode apresentar sensibilidade diferencial a Metalaxyl em função da natureza de isolados e outros fatores circunstanciais que podem interferir neste processo.

Oxathiapiprolin é um produto com ação de contato, com leve atuação translaminar que interfere em processos de síntese de oxysteróis na célula de oomicetos. Trata-se de um mecanismo diferente do produto Metalaxyl que atua em processos de síntese de ácidos nucleicos nas células dos organismos sensíveis. A propriedade de atuação de Oxathiapiprolin em baixas concentrações, conforme observado neste trabalho, faz com que sua inclusão em formulações comerciais seja possível em frações inferiores a de outros produtos na mesma linha de utilização, o que significa uma vantagem sob vários aspectos.

A inibição do crescimento micelial de *P. sojae* por Oxathiapiprolin, foi de 100% em todas as concentrações testadas neste ensaio. Essa informação já revelada por Hegstad et al. (2021) que demonstrou que a dose muito baixa de 0,012 mg i.a./semente<sup>-1</sup> somado a baixa solubilidade da molécula demonstra sua forte atividade.

Segundo Miao et al. (2015) doses em torno de 10 µg.mL foram capazes de inibir a liberação e motilidade de zoósporos em *Phytophthora capsici* além de proporcionar atividade protetora e curativo do produto contra o desenvolvimento da infecção em plantas de pimenta em condições de casa de vegetação e em testes de campo.

Hegstad et al. (2021) relatam também que resultados de avaliações de eficácia em laboratório e dados de campo são suficientes para assumir que o tratamento de sementes com Oxathiapiprolin constitui uma ferramenta de manejo eficaz para os produtores de soja, proporcionando eficácia contra diferentes raças de *P. sojae* e melhorando a emergência,

vigor e rendimento final de grãos. Além disso, este trabalho demonstrou os benefícios sinérgicos quando a Oxathiapiprolin foi combinada com outros componentes como Ipconazole e/ou Picoxystrobin na melhoria de características agronômicas das sementes tratadas.

Em relação aos dois outros produtos que compõem a mistura testada neste trabalho, observa-se que ambos apresentaram efeitos, apesar de baixo, no crescimento micelial de *P. sojae*, porém em intensidade que não conferem a eles a eficácia desejável para uso dos mesmos de forma isolada contra *P. sojae* em tratamento de sementes de soja. Apesar das reduções observadas das variáveis avaliadas, entende-se que a eficácia destes produtos pode ser considerada baixa em comparação com os demais produtos, Maxim Advanced, Apron e a mistura dos três ingredientes em fase de avaliação para registro no Brasil.

A atuação de Ipconazole nas avaliações in vitro deste trabalho, Figura 8, pode ser considerada ineficaz do ponto de vista de seu uso isolado para controle de *P. sojae*. Trata-se de um produto da classe dos triazóis não apresentando efeitos sobre membros de Oomicetos.

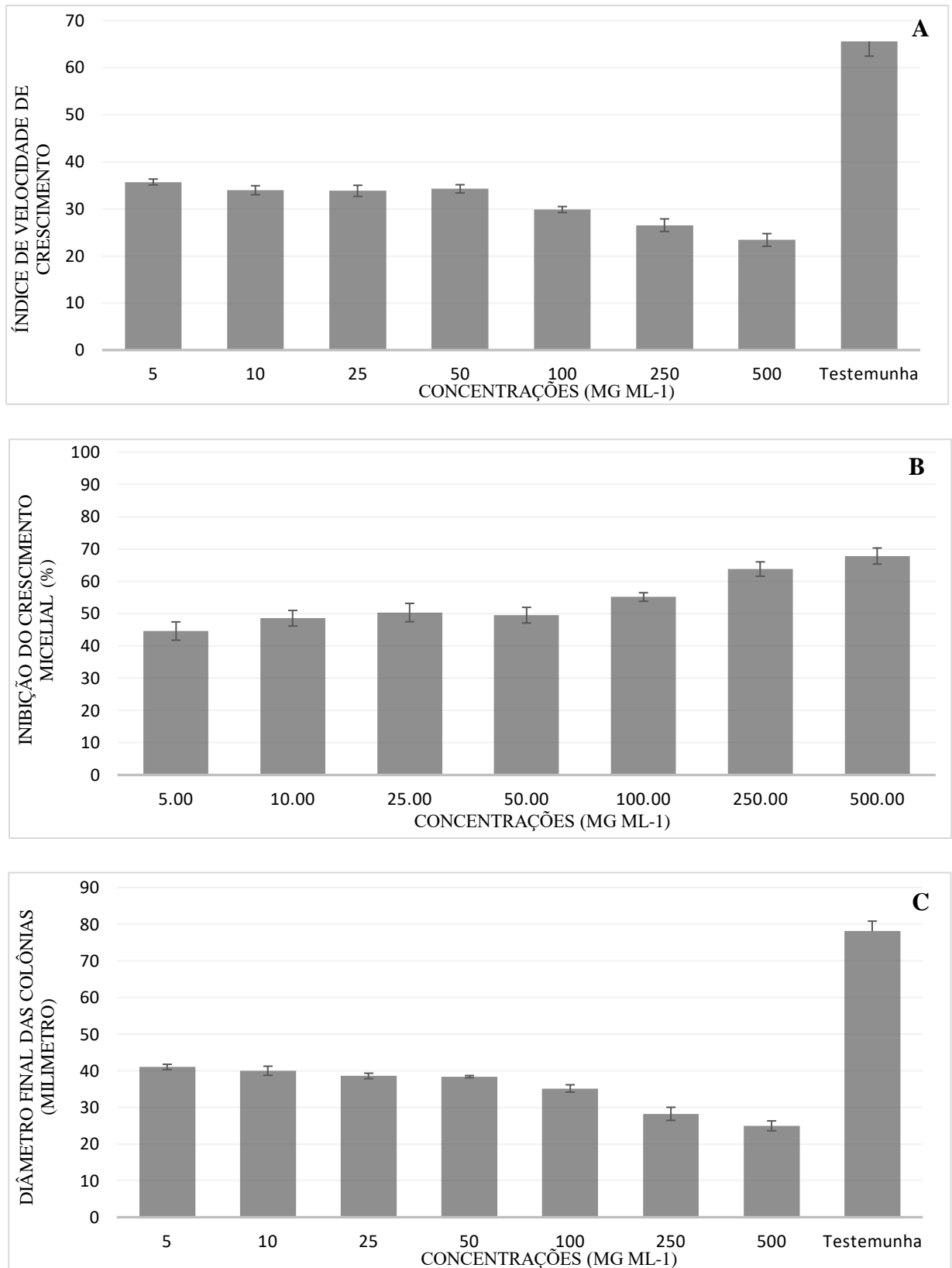


Figura 8: Índice de Velocidade de Crescimento micelial da colônia (A), porcentagem de inibição (B) e diâmetro final (C) da colônia de *P. sojae* em diferentes concentrações de Iaconazole in vitro.

Sua inclusão em formulações de produtos comerciais tem como objetivo ampliar o espectro de atuação destes produtos visando o controle de outros patógenos que afetam a soja e outras espécies vegetais. Nota-se que pelo PICM (Figura 8) somente nas concentrações mais elevadas do produto houve inibição razoável para avaliar a sensibilidade de *P. sojae* a este fungicida.

Importante ressaltar que pela visualização das colônias de *P. sojae* não observou-se a formação de estruturas de reprodução ou de sobrevivência do patógeno, sendo essa informação de grande significado, do ponto de vista epidemiológico.

O aumento das concentrações promoveu maior Porcentagem de Inibição Micelial (PICM), na concentração de 500 ppm houve inibição de 68% e na concentração de 5 ppm foi de 45%. Apesar de não ser tão eficiente quanto os produtos a base de Metalaxil sua utilização para o manejo de *P. sojae* pode ser, de certa forma, recomendável.

Importante demonstrar que o diâmetro da colônia diminuiu de acordo com o aumento das dosagens, corroborando com os percentuais de inibição do patógeno em confronto direto com o ingrediente ativo (i.a).

Sobre o outro ingrediente ativo, Picoxystrobin, avaliado isoladamente dos demais ingredientes da mistura PIO, observou-se também que os efeitos do mesmo sobre o crescimento de *P. sojae* pode ser considerado baixo ou ineficaz do ponto de vista prático. A exemplo do que ocorreu com Ipconazole, apenas nas concentrações mais elevadas, 250 e 500 mg/ml de Picoxystrobina houve uma redução mais pronunciada sobre o crescimento do patógeno pelo produto.

Houve uma tendência de similaridade de efeitos do produto entre as três variáveis utilizadas para avaliar estes efeitos *in vitro*, Figura 9. Pela literatura sabe-se que alguns membros do grupo das estrobilurinas podem afetar a motilidade dos zoósporos, que necessitam de um elevado nível de energia para locomoção (BARTLETT et al., 2002).

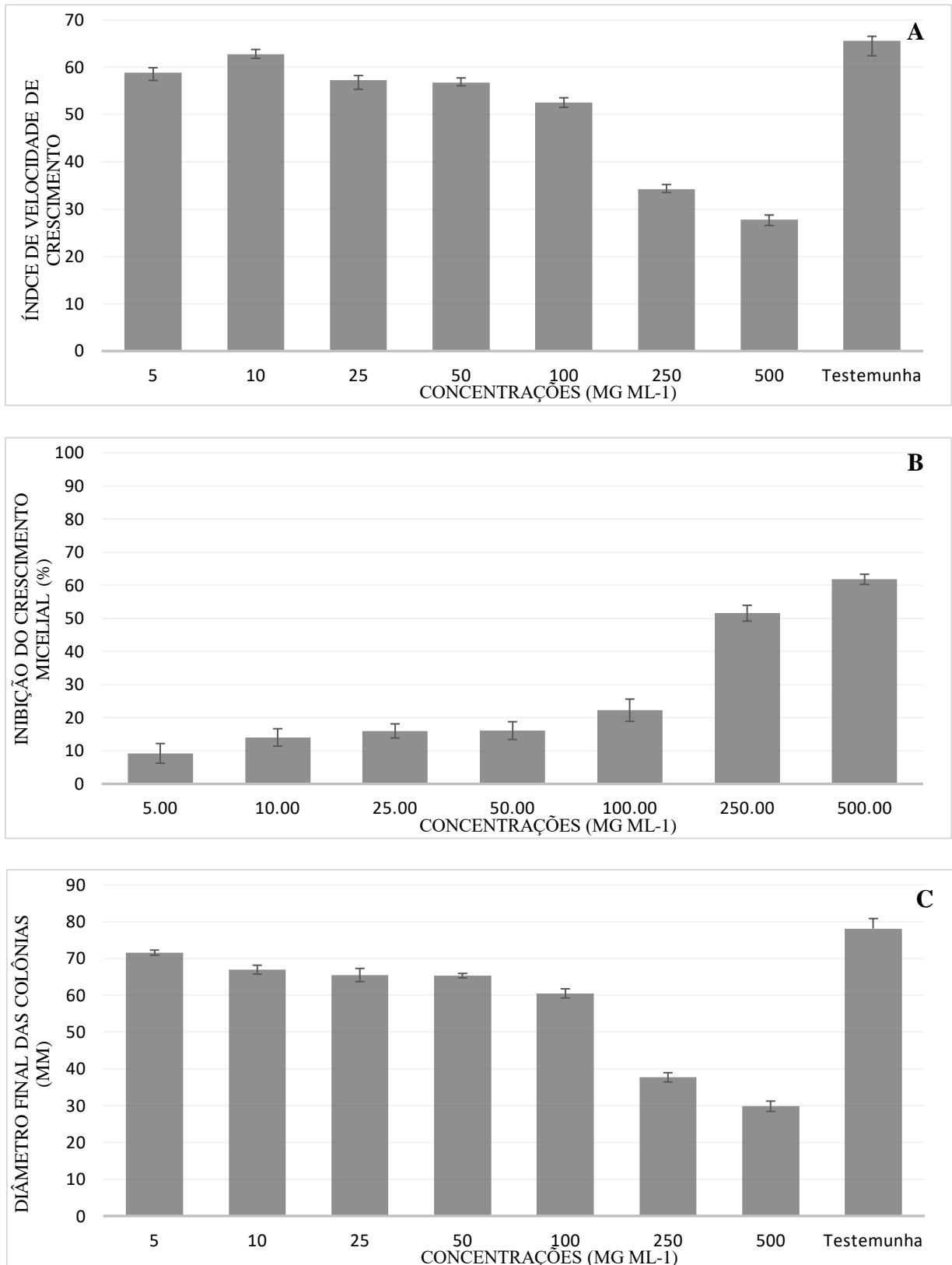


Figura 9: Índice de Velocidade de Crescimento micelial da colônia (A), porcentagem de inibição (B) e diâmetro final (C) da colônia de *P. sojae* em diferentes concentrações de Picoxistrobina in vitro.

Nota-se que o PICM (Figura 9) aumenta conforme aumenta a dosagem do ingrediente. Esses resultados mostram-se coerentes com os demonstrados por Hegstad et al. (2021) que utilizaram esse ingrediente ativo em mistura com Oxathiapiprolin e Iaconazol, e com os quais se observou efeito inibitório. Nesse caso a porcentagem de inibição da maior concentração (500 ppm) foi de 62% e a menor concentração (5 ppm) foi de 14%, controlando menos se comparado com Iaconazol em relação a PICM. O diâmetro final da colônia segue a mesma lógica, quanto maior a concentração menor o diâmetro em relação a testemunha.

Em relação ao aspecto da colônia e produção de estruturas típicas do patógeno, como clamidósporos, oósporos, esporângios etc diante da presença dos produtos testados, não foram observados padrões diferentes do que tem sido convencional para a espécie em foco.

O aspecto geral das colônias formadas em meio agarizado com Iaconazol e Picoxystrobin, não diferiram entre tratamentos. As características avaliadas estão descritas na tabela 9.

Tabela 9: Características morfológicas das colônias de de *P. sojae* formadas em todas as concentrações dostratamentos Iaconazole e Picoxystrobin: (-) negativo para característica e (+) positiva para característica.

Características	IPCONAZOL				PICOXYSTROBIN			
	1	2	3	4	1	2	3	4 <sup>1</sup>
Coloração branca com borda definida	-	-	-	-	+	+	+	+
Coloração branca sem borda definida	+	+	+	+	-	-	-	-
Micélio com aspecto cottonoso	+	+	+	+	-	-	-	-
Micélio com baixa densidade	-	-	-	-	+	+	+	+
Colônia aérea	+	+	+	+	+	-	+	-
Colônia parcialmente submersa no meio agarizado	-	-	-	-	+	+	+	+
Produção de estruturas reprodutivas e sobrevivência	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup>Repetições

Vale destacar que a ausência de formação de estruturas reprodutivas de propagação e sobrevivência do patógeno neste tipo de ensaio pode ser atribuído em parte a condição do isolado utilizado neste estudo. Sabe-se que manejo constante do patógeno em rotinas de laboratório podem interferir no comportamento do mesmo em alguns ciclos de sua utilização. É sempre recomendável a utilização de isolados recém obtidos de tecidos de plantas hospedeiras e em maior número para que haja melhor representatividade da diversidade que estes organismos podem apresentar na natureza.

Nas figuras 10 e 11 são representados os aspectos morfológicos das colônias de *P. sojae* desenvolvidas na presença dos ingredientes ativos em diferentes concentrações em meio agarizado, com avaliação realizada aos 6 dias de idade.

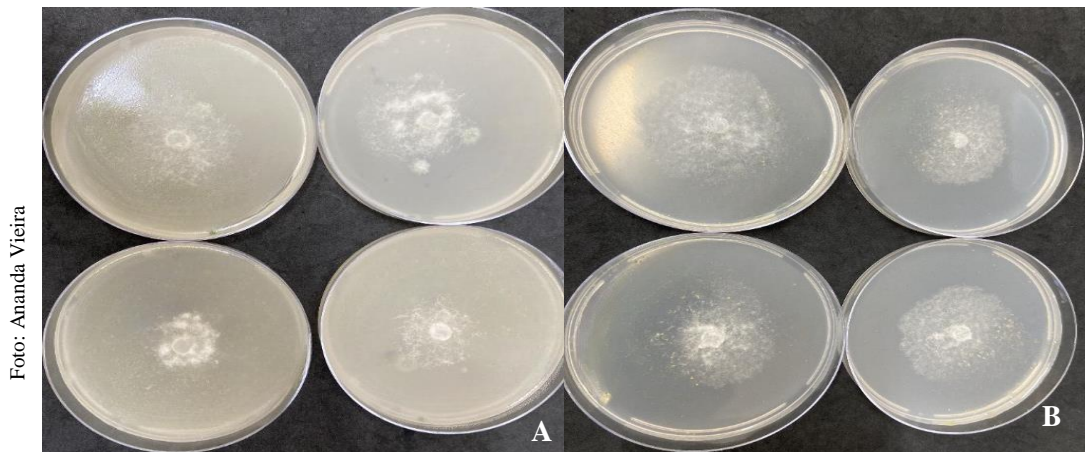


Figura 10: Aspecto morfológico das colônias de *P. sojae* em meio agarizado acrescido de Iaconazol: (A) concentração de  $500 \mu\text{g.ml}^{-1}$  e (B) concentração de  $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$ .

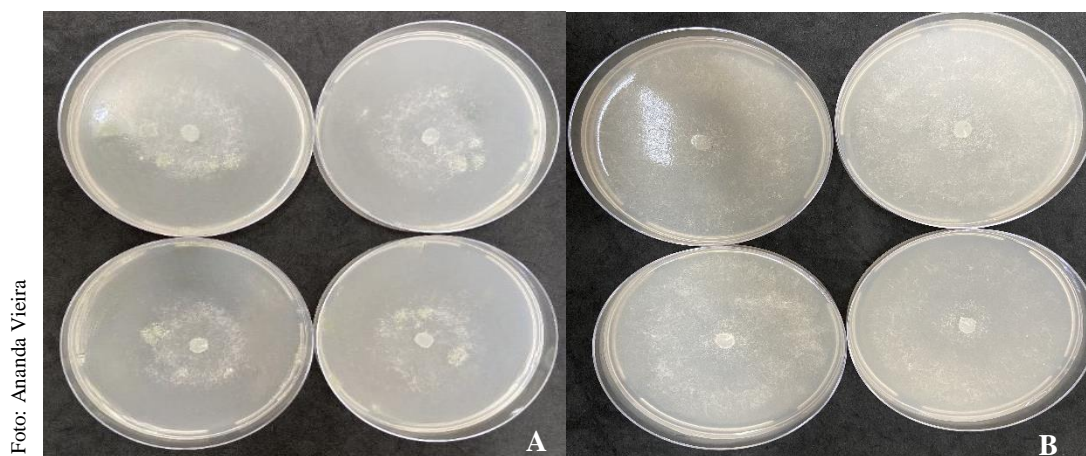


Figura 11: Aspecto morfológico das colônias de *P. sojae* em meio agarizado acrescido de Picoxystrobin: (A) concentração de  $500 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (B) concentração de  $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$ .

## 5 CONCLUSÕES

Pelas circunstâncias de realização deste trabalho não ficou caracterizada a transmissão de *P. sojae* de plantas às sementes de soja partindo-se de inoculação direcionada às vagens em dois estádios reprodutivos das plantas.

A presença de *P. sojae* em sementes de soja realizada pela inoculação artificial foi capaz de provocar reduções significativas no desempenho das sementes submetidas a dois níveis de inóculo do patógeno. Esta constatação evidencia que *P. sojae* pode ser transmitida de sementes secas inoculadas para plantas oriundas do processo de germinação.

*P. sojae* foi detectada em sementes e plantas de soja oriundas, somente, de sementes recém inoculadas, o que caracteriza o processo de transmissão do patógeno de sementes – plantas. Na avaliação de sementes inoculadas com o patógeno aos 30 dias de armazenamento não houve detecção do patógeno, o que indica perda de viabilidade deste patógeno a partir deste período.

Em relação a sensibilidade de *P. sojae* a fungicidas in vitro foram destaques os produtos Oxathiapiprolin, avaliado isoladamente e em mistura com dois outros produtos, havendo equivalência do mesmo aos produtos comerciais utilizados como padrões de referencia neste trabalho, os quais contém Metalaxyl em suas composições comerciais. Não houve crescimento micelial do patógeno em nenhuma das concentrações desses produtos partindo-se da concentração de 5 ug/ml.



## REFERÊNCIAS

- ABAD, Z.G. Methods for identification of *Phytophthora* species. Workshop: Fighting Phytophthora: How to Detect, Investigate, and Manage Phytophthora. Saint Paul: **American Phytopathological Society**, 2008.
- ABRASEM - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS**. Levantamento estatístico. Taxa de utilização de sementes. Brasil, 2012/2013.
- ALFENAS *et al.* Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV. p. 53-90, 2007.
- ARAÚJO, D. V. Caracterização molecular, patogenicidade e transmissão pela semente de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em algodoeiro. 2008. 102 p. **Tese** (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- BALBINOT JUNIOR *et al.* **Semeadura cruzada em cultivares de soja com tipo de crescimento determinado**. Semina: Ciências Agrárias, v. 36, n. 3, 2015.
- BARROCAS, E. N. Efeitos de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes e plantas de algodoeiro e detecção, por meio de PCR, de *Stenocarpella* sp. em sementes de milho inoculadas. 2008. 110 p. **Tese** (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- BARROS, F. D. Avaliação dos efeitos e transmissão de isolados de *Bipolaris* em sementes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. 2019. 43 p. **Dissertação** (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.
- BARTLETT, D.W.; CLOUGH, J.M.; GODWIN, J.R.; HALL, A.A.; HAMER, M.; PARRDO BRZANSKI L B. Review: The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**. Chichester, v.58, p.649-662, 2002.
- BASF**. Entenda a importância do tratamento de sementes na soja e milho. 2018
- BRASIL - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília. 399 p, 2009.
- BIENAPFL, J.C.; MALVICK, D.K.; PERCICH, J.A. Specific molecular detection of *Phytophthora sojae* using conventional and real-time PCR. **Fungal Biology**: Ardwick, v. 115, n.8, p. 733-740, abr. 2011.
- BOTELHO, L. S. Detecção, transmissão e efeitos de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja. Lavras: UFLA (**Tese – doutorado**), 2011.
- CARVALHO, Marina Mouzinho. Influência de sistemas de semeadura na população de pragas e nas características morfofisiológicas em cultivares de soja. Botucatu/SP: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia). Mar/2014. 66p.
- CARVALHO *et al.* Action of defense activator and foliar fungicide on the control of Asiatic

rust and on yield and quality of soybean seeds. **Journal of Seed Science**, v.35, p.198- 206, 2013.

COHEN Y. 2020. Root treatment with oxathiapiprolin, bentiavalicarb or their mixture provides prolonged systemic protection against oomycete foliar pathogens. **PLoS ONE** 15[1]: e0227556. pmid:31929586.

COHEN Y., RUBIN A.E. AND GALPERIN M. 2019. Novel synergistic fungicidal mixtures of oxathiapiprolin protect sunflower seeds from downy mildew caused by *Plasmopara halstedii*. **PLoS ONE** 14[9]: e0222827. pmid:31545821.

COHEN Y., AND RUBIN A.E. 2020. A new strategy for durable control of late blight in potato by a single soil application of an oxathiapiprolin mixture in early season. **PLoS ONE** 15[8]: e0238148. pmid:32822425

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos** – Safra 2015/16, v.3, n.12, Brasília, p.1-184, 2016.

COSTA, P.S.C. Teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de café (*coffea arabica L.*). **Tese (Doutorado)** – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG. 81p, 2003.

COSTA, E. M.; VENTURA, M. V. A.; ARANTES, B. H. T.; DE MORAES NUNES, B.; CHAGAS, J. F. Efeito fisiológico de inseticidas e fungicida sobre a germinação e vigor de sementes de soja. **Anais da Semana Agrônômica da Faculdade Evangélica de Goianésia**, v. 8, 2018.

COSTAMILAN, L.M.; CLEBSCH, C.C. Técnicas utilizadas para estudos com *Phytophthora sojae* na Embrapa Trigo – Passo Fundo: **Embrapa Trigo**, 2016.

COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P. F.; MORAES, R. M. A. de. Podridão radicular de fitóftora em soja. Passo Fundo: **Embrapa Trigo**, 2007. 23 p. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 79).

COSTAMILAN *et al.* Ocorrência de *Phytophthora sojae* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 395, 1996.

DRAPER, M. A.; CHASE, T. *Phytophthora* Root and Stem Rot (PRR) of Soybean. **South Dakota Extension Fact Sheet: Brookings**. v. 902-B, p. 4, 2001.

DORRANCE, A. E.; MILLS, D. *Phytophthora* Damping Off and Root Rot of Soybean. **FACT SHEET**: Agriculture and Natural Resources, Ohio, 2009.

FERREIRA, E.B.; CAVALCANTI, P.P.; NOGUEIRA, D.A. ExpDes: An R Package for ANOVA and Experimental Designs. **Applied Mathematics**, [S. l.], v. 5, n. 19, p. 2952–2958, 2014. ISSN: 2152-7385. DOI: 10.4236/AM.2014.519280.

FRY, W. E.; GRÜNWARD, N. J. Introduction to oomycetes. In: THE PLANT health instructor. St. Paul: **The American Phytopathological Society**, 2010. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/pathogengroups/pages/introoomycetes.aspx>>.

Acessado em: 22 nov. 2020.

GESTEIRA, G. de S. Seleção de linhagens de soja precoce para produtividade e qualidade de grãos. **Dissertação** (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras. Lavras. p.58. 2017.

GIESLER, L.; J.; BRODERICK, K.; C. Management of Phytophthora Root and Stem Rot of Soybean. **Nebraska: Nebraska Extension**, 2016.

GUIMARÃES, M.; R.; F. Avaliação do potencial de inóculo de patógenos em sementes: sua relação com a qualidade fisiológica e quantificação do DNA fúngico por qPCR. **Dissertação** (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de Lavras, 2016.

GODOY *et al.* Doenças da soja. In: AMORIM *et al.* **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. Cap. 67. P. 657-676. V.2. Editora Agronômica Ceres Ltda. Ouro Fino-MG, 2016.

HANADA, R.E. Controle de *Phytophthora palmivora*, agente causal da podridão-parda dos frutos de cacaueteiro, com fungos endofíticos. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Amazonas, 2006.

HARTMAN, G. L. Worldwide importance of soybean pathogens and pests. In: HARTMAN *et al.* **Compendium of soybean diseases**. 5th ed. St. Paul: APS Press. p. 4-5, 2015.

HEGSTAD, J, GASPAR, AP, FENG, L, LACKERMANN, K, HUDSON, A, & HOWIESON, M. Agronomic and efficacy evaluations of oxathiapiprolin as a soybean seed treatment. **Agronomy Journal**, 2021; 113, 4850–4864.

HENNING *et al.* **MANUAL DE IDENTIFICAÇÃO DE DOENÇAS DA SOJA**. Embrapa, Londrina. ed. 5, 2014.

LANNON, K. *Phytophthora sojae*. **NC State University**. 2010.

MACHADO, A.Q.; MACHADO, J.C. Estudo da relação entre o potencial de inóculo de *Fusarium verticillioides* (syn. *F. moniliforme*) e o desempenho inicial de sementes de milho por meio da técnica de restrição hídrica. Resumos, **7º Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes**, Sete Lagoas, MG. p. 453, 2002.

MACHADO, J. C.; POZZA, E. A. Razões e procedimentos para o estabelecimento de padrões de tolerância a patógenos em sementes. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Sementes qualidade fitossanitária**. Viçosa, MG: UFV. p. 219-248, 2005.

MACHADO *et al.* Methodology for infecting seeds by fungi using water restriction technic. In: **INTERNATIONAL SEED TESTING CONGRESSSEED SYMPOSIUM**, 26. Angers. Proceedings...Angers: ISTA. p. 62, 2001.

MACHADO *et al.* Uso da técnica de restrição hídrica ou “Condicionamento Osmótico” em patologia de sementes. **RAPP**. v. 20, 2011.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling

emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p.176-77, 1962.

MAIS SOJA. Doenças em soja: o manejo não pode parar. **MAIS SOJA - Pensou Soja, Pensou Mais Soja**, 2020. Disponível em: <<https://maissoja.com.br/doencas-em-soja-o-manejo-nao-pode-parar/>>. Acesso em: 27 Fev. 2021.

MIAO, J.; DONG, X.; LIN, D.; WANG, Q.; LIU, P.; CHEN, F.; DU, Y.; LIU, X. Activity of the novel fungicide oxathiapiprolin against plant-pathogenic oomycetes. **Pest Manag Sci**. 2016.

OLIVEIRA, J. A. Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas L.*) e pimentão (*Capsicum annanum L.*). 1991. 111 f. **Dissertação (Mestrado em Fitossanidade)** – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.

PEREIRA *et al.* Reação de genótipos de abóbora e morangas a *Phytophthora capsici*. **Hortic. Bras.**, Vitória da Conquista. v. 35, n. 4, p. 599-603, 2017.

PEREIRA, R.B.; SILVA, P.P.S; NASCIMENTO, W.M.; PINHEIRO, J.B. Tratamento de Sementes de Hortaliças. **Circular técnica. Embrapa Hortaliças**, Brasília-DF, 2015.

POPINIGIS, F. Fisiologia da semente. Brasília: **AGIPLAN**, 1977. 289 p.

RADMER, L.; ANDERSON, G.; MALVICK, D. M.; KURLE, J.E.; RENDAHL, A. E.; MALLIK, A. *Pythium*, *Phytophthora* e *Phytophthora* spp. associados à soja em Minnesota, sua relativa agressividade à soja e ao milho e sua sensibilidade aos fungicidas no tratamento de sementes. **Plant Disease**, v. 101, n. 1, p. 62-72, 2017.

RICHARDSON, MJ. An annotated list of seed-borne diseases. 3.ed. Kew, Commonwealth Mycological Institute, 1979. 320p. (**Phytopathological Papers**, 23)

ROESE, A.D.; GOULART, A.C.P.; SOARES, R.M. Podridão-de-fitóftora em soja avança no centro-oeste. **Comunicado técnico** (235). Dourados - MS, 2018.

ROSSMAN, A.Y.; PALM, M.E. Why are *Phytophthora* and other Oomycota not true Fungi? **USDA Agricultural Research Service**, USDA Animal and Plant Health Inspection Service, Systematic Botany & Mycology Laboratory. Beltsville, Maryland, 2007. Disponível em:<<https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/oomycete/introduction/Pages/Oomycetes.aspx>>Acesso em: 27 Fev. 2021.

SANTOS *et al.* Radioterapia e Termoterapia como tratamentos de sementes de Soja. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**. vol. 9, n. 2, p. 37-44, 2016.

SARAN, P. E. MANUAL DE IDENTIFICAÇÃO DAS DOENÇAS DA SOJA. **Coletânea FMC: cada dia mais completa**. Disponível em: <<http://www.faesb.edu.br/biblioteca/wpcontent/uploads/2017/09/publication1.pdf>>

SCHMITTHENNER, A. F.; DORRANCE, A.E. *Phytophthora* root and stem rot. In: HARTMAN *et al.* (Ed.). **Compendium of soybean diseases and pests**. 5th ed. Saint Paul: APS Press. p. 73-76, 2015.

SEDIYAMA, T. Tecnologia de produção e usos da soja. Londrina: **Mecenas**. 314p, 2009.

SILVA, U.A. Efeitos e transmissão de *Amphobotrys ricini* em sementes de mamona. Lavras-UFLA (**Dissertação** – mestrado), 2013.

SMITH, K.L. Soybean Disease Management Fungicide Efficacy for Control of Soybean Seedling Diseases. **Crop Protection Network**. Disponível em: <<https://crop-protection-network.s3.amazonaws.com/publications/fungicide-efficacy-for-control-of-soybean-seedling-diseases-filename-2020-03-18-150238.pdf>>.

SOARES, R.M. Manejo de doenças radiculares da soja causada por *Pythium*, *Phytophthora* e *Rhizoctonia*. **Embrapa Soja**, Londrina (PR), 2011. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/47573/1/rafael.manejo.pdf>>. Acesso em: 12 Fev. 2021.

SOUZA, J. T. DE; LUZB, E. D. M. N.; PAIMB, M. C.; CERQUEIRA, A. O. **Uso de ferramentas moleculares na taxonomia de *Phytophthora***. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA. Maringá: Fitopatologia Brasileira. v. 32, p. S.40-41, 2007.

SOUSA, M. V. Metodologias de inoculação e detecção de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). 2006. 68 p. **Dissertação** (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

SYNGENTA (2017) – **Maxim XL: Fungicida/Tratamento de sementes**. [cit. 2017-06-25]. <https://www.syngenta.com.br/product/crop-protection/fungicidatratamento-de-sementes/maxim-xl>

TEIXEIRA, H.; MACHADO, J. Transmissibilidade e efeito de *Acremonium strictum* em sementes de milho. **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, v.25, n. 5, p. 1045-1052, set./out. 2003.

URBEN, F.A.; MAGALY, M.; CÍCERO, S.M. Ocorrência de fungos em sementes de seringueira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 17, n. 11, p. 1633–1637, 1982.

WATERHOUSE, G. M. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. **Mycological papers**, Kew. n. 92, p. 22, 1963.

WORKNEH, F.; TYLKA, G.L.; YANG, X.B.; FAGHIHI, J.; FERRIS, J.M. Regional assessment of soybean brown stem rot, *Phytophthora sojae*, and *Heterodera glycines* using area-frame sampling: Prevalence and effects of tillage. **Phytopathology** 89, p.204-211, 1999.

JIN *et al.* (Eds.), Proceedings of the 7th International Working Conference on Stored-Product Protection, 14-19 October 1998, Beijing, China. **Sichuan Publishing House of Science and Technology**, Chengdu, China, 1999. (ISBN 7536440987)