

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

GABRIELA SILVA MOURA

**Transmissão, Detecção e Controle de *Didymella bryoniae* em pepino e  
Infecção em melão**

Maringá

2013

GABRIELA SILVA MOURA

**Transmissão, Detecção e Controle de *Didymella bryoniae* em pepino e Infecção em melão**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor

Área de concentração: Proteção de Plantas

Orientador: Prof. Dr.º João Batista Vida

Maringá

2013

## AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre presente na minha vida, dando-me força, coragem e por tudo que tem me proporcionado.

Aos meus pais César e Maria da Conceição e irmãs, Patrícia e Daniela, agradeço por todo amor e apoio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Dr. João Batista Vida, minha gratidão pela oportunidade de ser sua orientada, pela confiança, paciência, ensinamentos, dedicação e amizade durante todos esses anos.

A professora Dr<sup>a</sup>. Adriana Gonela, pelos ensinamentos, conselhos e amizade.

Ao professor Dr. Willian Mário de Carvalho Nunes pela disponibilização do laboratório de Biologia Molecular e apoio na implantação deste trabalho.

Aos professores participantes da Banca, pela participação e honrosa contribuição.

Aos amigos Marcelo Paes, Paulo Maraus, Ricardo Oliveira, Aniele Andrade e Caroline de Marchi Bordon, muito obrigado pelo companheirismo e auxílio nos trabalhos.

Ao técnico Carlos Alexandre Zanutto muito obrigado pelo auxílio nas análises moleculares.

Ao Gilmar Franzener, pela ajuda profissional, paciência e companheirismo nesses anos de convivência.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia (PGA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), pela oportunidade concedida à realização do curso de Pós-graduação em nível de doutorado.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **Transmissão, Detecção e Controle de *Didymella bryoniae* em pepino e Infecção em melão**

### **RESUMO**

A cultura do pepino (*Cucumis sativus* L.) e meloeiro (*Cucumis melo* L.) pertencem à família das Cucurbitaceas. Esta família é formada por cerca de 80 gêneros e mais de 800 espécies, constituindo-se numa das mais importantes famílias de plantas utilizadas para a produção de alimentos mundialmente. Na Região Sul do Paraná, tem sido dado grande destaque para o cultivo de pepino partenocárpico e meloeiro nobre, realizado sob condições de cultivo protegido, principalmente em estufas plásticas. Nesses agrossistemas, patógenos fúngicos, como o agente causal da podridão gomosa, *Didymella bryoniae* (Auersw) Rehm, podem causar danos de várias magnitudes, inclusive inviabilizar o agronegócio, quando estratégias de controle forem inadequadas. Os sintomas e danos podem variar conforme a idade da planta e a parte afetada. Nas plântulas, o patógeno pode causar tombamento, assim como, manchas circulares nos cotilédones. Em plantas mais desenvolvidas, provoca o cancro nas hastes, com fendilhamento longitudinal do córtex e exposição do lenho, às vezes, com exsudação de goma, que resulta na morte do ramo ou da planta inteira, conforme o local da lesão. Nas folhas, aparecem manchas necróticas circulares que crescem e coalescem, provocando queima parcial. Nos frutos, podem ocorrer manchas escuras, circulares e aprofundadas, com exsudação de goma. Raízes de pepino, quando infectadas, apresentam coloração escura devido à presença de pseudotécios. O controle de podridão gomosa pode ser feito por meio de uso de sementes livres do patógeno, rotação de culturas, eliminação de cucurbitáceas silvestres, desinfestação do solo de cultivo, uso de fungicidas e irrigação adequada. Atualmente não se tem relatos de germoplasma de pepino resistente a *D. bryoniae*. Assim, as formas mais utilizadas para o controle de *D. bryoniae* têm sido o tratamento de sementes e pulverizações com fungicidas registrados para a cultura. Para o pepino partenocárpico, poucos trabalhos foram desenvolvidos abordando sobre este patossistema no mundo e, principalmente no Brasil. Assim, esse trabalho objetivou estudar a transmissão de *D. bryoniae* de sementes para planta e o controle da podridão gomosa em pepino partenocárpico e meloeiro nobre. No Capítulo I, para os testes de transmissão em casa-de-vegetação a porcentagem de transmissão de *D. bryoniae* foi de 7,0 % para o substrato comercial a base de casca carborizada de *Pinus* sp. e de 11,5 % para o substrato solo:areia.

Nos testes em câmara de incubação, a transmissão foi de 3,5 % em substrato ágar-água e 1,5 % em vermiculita. A transmissão do patógeno *D. bryoniae* em sementes de pepino foi experimentalmente demonstrada pelo teste de sintomas em mudas *in vitro* e *in vivo*, com maior incidência quando transplantadas para substrato solo:areia. No Capítulo II, foi possível a detecção qualitativa do patógeno *D. bryoniae*, por meio da PCR Multiplex, nas três quantidades de sementes de pepino utilizadas (50, 100 e 200), sem embebição em água. No Capítulo III, a partir da PCR Multiplex foi possível constatar a presença do patógeno em plantas assintomáticas, demonstrando a ocorrência de infecção latente em plântulas de pepino partenocárpico. No Capítulo IV, os resultados mostraram que o tratamento de sementes associado à pulverização foliar na cultura com piraclostrobina constitui eficiente estratégia para o controle da podridão gomosa em pepino partenocárpico híbrido ‘Hokushin’ cultivado em estufa plástica. No cultivo verão-outono foi obtida maior produtividade de pepino partenocárpico em relação ao cultivo primavera-verão. No Capítulo V, os resultados mostraram que houve efeito da enxertia na redução das lesões de podridão gomosa em pepino partenocárpico ‘Hokushin’. Para as plantas inoculadas no hipocótilo do enxerto e as inoculadas na região enxerto/porta-enxerto, as lesões atingiram área de 3,45 e 2,57 cm<sup>2</sup>, respectivamente. No Capítulo VI, através da PCR Multiplex foi possível constatar no caule de plantas assintomáticas de meloeiro nobre a ocorrência de infecção latente. Em fragmentos assintomáticos do caule a 5, 15 e 30 cm do tecido sintomático de meloeiro nobre foi possível comprovar a infecção sistêmica de *D. bryoniae*.

**Palavras-chave:** *Cucumis sativus*. *Cucumis melo*. Podridão gomosa. Patologia de sementes. Controle químico.

## **Transmission, Detection and Control of *Didymella bryoniae* in cucumber in Infection in melon**

### **ABSTRACT**

The culture of cucumber (*Cucumis sativus* L.) and melon belongs (*Cucumis melo* L.) belong the Cucurbitaceae family. This family consists of about 80 genera and more than 800 species, constituting one of the most important families of plants used for food production worldwide. In southern Paraná, has been a major focus for the cultivation of parthenocarpic cucumber and muskmelon, performed under conditions of protected cultivation, especially in plastic greenhouses. In southern Paraná, has been given great emphasis on the cultivation of parthenocarpic cucumber, conducted under greenhouse conditions, basically in plastic greenhouses. In this agroecosystem, fungal pathogens, such as the causal agent of gummy rot (*Didymella bryoniae*) can cause damage to various magnitudes, including agribusiness derail when control strategies are inadequate. Symptoms and damage can vary depending on the age of the plant and the affected part. In seedlings, the pathogen can cause tipping, as well as circular spots on the cotyledons. In more developed plants, causes cancer stems with longitudinal splitting of the wood cortex and exposure sometimes with exudate gum, which results in the death of the whole plant or branch, depending on the injury site. In leaves, necrotic spots appear circular that grow and coalesce, causing partial burning. In fruits, dark spots can occur, circulars and in-depth, with exudation of gum. Roots of cucumber, when infected, have dark color due to the presence pseudothecium. The control of decay gummy can be done through use of pathogen free seeds, crop rotation, elimination of wild cucurbits, disinfestation of the soil cultivation, use of fungicides and adequate irrigation. Currently there is no reports of cucumber germplasm resistant to *D. bryoniae*. Thus the forms used for the control of *D. bryoniae* have been the seed treatment and fungicide sprays registered for culture. For parthenocarpic cucumber, few studies have been developed addressing on this pathosystem in the world, and especially in Brazil. Thus, this study investigated the transmission of *D. bryoniae* seed to plant and rot control in cucumber gummy Japanese in muskmelon. In Chapter I, for testing transmission in a green house the percentage of transmission of *D. bryoniae* was 7.0% and 11.5% for the commercial substrate base carborizada bark of *Pinus* sp. soil and sand, respectively. In the tests where the incubation chamber, the transmission was 3.5% and 1.5% water-agar substrate and vermiculite, respectively. The transmission of the pathogen *D. bryoniae* on cucumber seeds was

experimentally demonstrated by test symptoms in seedlings in vitro and in vivo, with greater incidence when transplanted to substrate: sand. In Chapter II, it was possible the qualitative detection of the pathogen *D. bryoniae*, by Multiplex PCR, the three quantities used cucumber seeds (50, 100 and 200) without soaking in water. In Chapter III, from the Multiplex PCR, we determined the presence of the pathogen in asymptomatic plants, demonstrating the occurrence of latent infection in parthenocarpic cucumber seedlings. In Chapter IV, the results showed that seed treatment combination for foliar culture with pyraclostrobin are efficient strategy for the control of brown rot in Japanese cucumber hybrid gummy 'Hokushin' grown in greenhouse. In the summer-autumn crop was obtained higher productivity parthenocarpic cucumber over the spring-summer cultivation. In Chapter V, the results showed an effect of grafting in reducing injuries to rot in cucumber gummy parthenocarpic 'Hokushin'. For plants inoculated in the hypocotyl graft and inoculated in the region graft / rootstock, injuries hit area of 3,45 and 2,57 cm<sup>2</sup>, respectively. In Chapter VI, by Multiplex PCR, we determined the stem of asymptomatic plants of melon noble the occurrence of latent infection. In asymptomatic stem fragments at 5, 15 and 30 cm tissue symptomatic melon noble was possible to prove the systemic infection of *D. bryoniae*.

**Keywords:** *Cucumis sativus*. *Cucumis melo*. Gummy stem blight. Seed pathology. Chemical control.





## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

**Tabela 1.** Transmissão de *Didymella bryoniae* (%) de sementes para plantas de pepino partenocárpico híbrido ‘Hokuskin’ em substrato Plant Max HF® e solo:areia em casa-de-vegetação..... 9

**Tabela 2.** Transmissão de *Didymella bryoniae* (%) de sementes para plantas de pepino partenocárpico híbrido ‘Hoshukin’ nos substratos ágar-água e vermiculita em câmara de incubação..... 12

### CAPÍTULO II

**Tabela 1.** Amostras positivas para o patógeno *Didymella bryoniae* em sementes de pepino partenocárpico híbrido ‘Hokushin’ por PCR Multiplex em relação a amostras avaliadas..... 27

### CAPÍTULO III

**Tabela 1.** Detecção por PCR Multiplex de infecção latente de *Didymella bryoniae* em caules de plântulas de pepino partenocárpico assintomáticas, do híbrido ‘Hokuskin’, a partir por sementes não-tratadas, tratadas com piraclostrobina e tratadas com piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil, semeadas em substrato..... 46

**Tabela 2.** Detecção por PCR Multiplex de infecção latente de *Didymella bryoniae* em caule de plântulas de pepino partenocárpico assintomáticas, do híbrido ‘Hokuskin’, a partir por sementes não-tratadas, tratadas com piraclostrobina e tratadas com piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil, semeadas em solo:areia..... 47

### CAPÍTULO IV

**Tabela 1.** Produção e classificação dos frutos de pepino partenocárpico, híbrido ‘Hokushin’, cultivado em estufa plástica, usando semi-hidroponia em areia lavada, período primavera-verão..... 65

**Tabela 2.** Eficiência de fungicidas no controle de podridão gomosa em plantas de pepino partenocárpico, híbrido ‘Hokushin’ cultivadas em verão-outono, em ambiente protegido, expressada pela área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD)..... 68

**Tabela 3.** Produção e classificação dos frutos de pepino partenocárpico híbrido ‘Hokushin’ cultivado em estufa plástica, usando semi-hidroponia em areia lavada, período verão-outono..... 72

### CAPÍTULO V

**Tabela 1.** Severidade de podridão gomosa em plantas de pepino partenocárpico híbrido ‘Hokushin’ enxertadas em abóbora Shelper e em plantas pé-franco e inoculadas com *Didymella bryoniae* ..... 88

### CAPÍTULO VI

**Tabela 1.** Infecção latente de *Didymella bryoniae* em plântulas de meloeiro nobre

assintomáticas do híbrido Bonus II detectada por PCR Multiplex, a partir do DNA total extraído do caule.....	108
<b>Tabela 2.</b> Infecção latente de <i>Didymella bryoniae</i> em plantas de meloeiro nobre assintomáticas do híbrido Bonus II detectada por PCR Multiplex, a partir do DNA total extraído do caule.....	110
<b>Tabela 3.</b> Detecção de infecção sistêmica de <i>Didymella bryoniae</i> em plantas de meloeiro nobre híbrido Bonus II por PCR Multiplex com DNA total extraído de fragmentos de diferentes localizações do caule.....	113

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura 1.** Plantas de pepino partenocárpico em substrato comercial (A) e em substrato solo:areia lavada (B) em casa-de-vegetação semi-climatizada..... 7
- Figura 2.** Plantas de pepino partenocárpico híbrido ‘Hokushin’ apresentando sintomas e sinais de podridão gomosa nas folhas cotiledonares (A) e primeira folha definitiva (B)..... 10
- Figura 3.** Planta de pepino partenocárpico híbrido ‘Hokushin’ em meio ágar-água (A) e em vermiculita (D). Planta de pepino partenocárpico híbrido ‘Hokushin’ com sintomas de podridão gomosa em meio ágar-água (B) e em vermiculita (C)..... 12

### CAPÍTULO II

- Figura 1.** Gel de eletroforese apresentando especificidade na reação múltipla para *Didymella bryoniae* em amostras de DNA total de sementes. L- 1-100 pb ladder; C<sup>+</sup> - controle positivo; C<sup>-</sup> - controle negativo; Híbrido ‘Hokushin’: A) 1 a 4 - Amostras na quantidade de 50 sementes sem embebição; 5 a 12 - 100 sementes sem embebidas; 13 a 20 - 200 sementes sem embebição; 21 a 24 - 50 sementes embebidas por 24 horas; 25 a 27 - 100 sementes embebidas por 24 h; B) 28 a 32 - 100 sementes embebidas por 24 h; 33 a 40 - 200 sementes embebidas por 24 h; 41 a 44 - 50 sementes embebidas por 48 h; 45 a 50 - 100 sementes embebidas por 48 h; C) 51 a 52 - 100 sementes embebidas por 48 h e 53 a 60 - 200 sementes embebidas por 48 h..... 28

### CAPÍTULO III

- Figura 1.** Sintoma de *D. bryoniae* no tecido cotiledonar. .... 45
- Figura 2.** Gel de eletroforese apresentando especificidade na reação múltipla para *D. bryoniae*. L – 1 Kb pb ladder; C<sup>+</sup> – Isolado de *D. bryoniae* (controle positivo); C<sup>-</sup> – controle negativo; Plantas assintomáticas de pepino ‘Hokushin’ cultivadas em substrato Plant Max HF<sup>®</sup>: A) 1 a 4 – Amostras coletada aos 4 dias após emergência (DAE); 5 a 8 – Amostras coletadas oito DAE; 9 a 12 – Amostras coletadas aos 12 DAE; 13 a 16 – Amostra coleta aos 16 DAE B) 17 a 20 – Amostras coletadas aos 20 DAE; 21 a 24 – Amostras coletadas aos 24 DAE; 25 a 28 – Amostras coletadas aos 28 DAE, 29 a 32 – Amostras coletadas aos aos 32 DAE..... 48

### CAPÍTULO IV

- Figura 1.** Relação A/B. Distância mais curta entre a base e o ápice do pepino (a) e o lado externo do fruto (b)..... 62
- Figura 2.** Classificação comercial de pepino partenocárpico. A- retos; B – médios/intermediários e c – tortos..... 63

**Figura 3.** Incidência de podridão gomosa em pepino partenocárpico (híbrido ‘Hokushin’) em estufa plástica sob os tratamentos: T1 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes; T2 - plantas originadas de sementes não tratadas e mudas pulverizadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T3 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes e mudas tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T4 – plantas originadas de sementes e mudas não tratadas e cultura pulverizada com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T5 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes e cultura tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T6 – plantas originadas de muda e cultura tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T7 – plantas originadas de sementes, mudas e cultura não tratadas (controle negativo); T8 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes, mudas e cultura tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L (controle positivo). Cultivo verão-outono, Maringá, 2012..... 67

**Figura 4.** Severidade da podridão gomosa em pepino partenocárpico (híbrido ‘Hokushin’) em estufa plástica sob os tratamentos: T1 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes; T2 - plantas originadas de sementes não tratadas e mudas pulverizadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T3 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes e mudas tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T4 – plantas originadas de sementes e mudas não tratadas e cultura pulverizada com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T5 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes e cultura tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T6 – plantas originadas de muda e cultura tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T7 – plantas originadas de sementes, mudas e cultura não tratadas (controle negativo); T8 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes, mudas e cultura tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L (controle positivo). Cultivo verão-outono, Maringá, 2012..... 69

## CAPÍTULO V

**Figura 1.** Plantas de pepino partenocárpico híbrido ‘Hokushin’ enxertadas em abóbora Shelper em câmara úmida pós-enxertia..... 84

**Figura 2.** A) Planta inoculada acima do ponto de enxertia; B) Inoculação no ponto de enxertia; C) Planta inoculada abaixo do ponto de enxertia..... 85

**Figura 3.** Severidade de podridão gomosa em plantas de pepino partenocárpico enxertadas em abóbora Shelper e inoculadas em pontos distintos: 1- Plantas do

híbrido de pepino partenocárpico enxertadas e inoculadas no hipocótilo do enxerto; 2 – Plantas do híbrido de pepino partenocárpico enxertadas e inoculadas na região de união enxerto/porta-enxerto; 3 – Plantas do híbrido de pepino partenocárpico enxertadas e inoculadas no hipocótilo do porta-enxerto; 4 – Plantas do híbrido de pepino partenocárpico, enxertadas; 5 – Plantas do híbrido ‘Hokushin’, em pé-franco, inoculadas no hipocótilo; 6 – Plantas de abóbora Shelper, inoculadas no hipocótilo..... 89

**Figura 4.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em plantas de pepino partenocárpico enxertadas em abóbora Shelper e em pé-franco, inoculadas em diferentes pontos: 1- Plantas de pepino partenocárpico enxertadas e inoculadas no hipocótilo do enxerto; 2 – Plantas do híbrido de pepino partenocárpico enxertadas e inoculadas na região de união enxerto/porta-enxerto; 3 – Plantas do híbrido de pepino partenocárpico enxertadas e inoculadas no hipocótilo do porta-enxerto; 4 – Plantas do híbrido de pepino partenocárpico, enxertadas em abóbora Shelper; 5 – Plantas do híbrido ‘Hokushin’, em pé-franco, inoculadas no hipocótilo; 6 – Plantas de abóbora Shelper, em pé-franco, inoculadas no hipocótilo Barras acompanhadas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott..... 90

## CAPÍTULO VI

**Figura 1.** Gel de eletroforese apresentando especificidade na reação múltipla para *Didymella bryoniae* em amostras de DNA total. A) Híbrido Bonus II: 1 – 100 pb Ladder; 2 – controle positivo; 3 – controle negativo; A) - 4 a 8. Plantas assintomáticas coletadas 1 dias após emergência (DAE); 9 a 13. Plantas assintomáticas coletadas 5 DAE; 14 a 18. Plantas assintomáticas coletadas 15 DAE; 19 a 23. Plantas assintomáticas coletadas 20 DAE; B) - 24 a 28. Plantas assintomáticas coletadas 30 DAE; 29 a 33 Plantas assintomáticas coletadas 40 DAE; 34 a 37 Plantas assintomáticas coletadas 50 DAE..... 109

**Figura 2.** Gel de eletroforese apresentando especificidade na reação múltipla para *Didymella bryoniae* em amostras de DNA total. A) Híbrido Bonus II: 1 a 6 – Amostras de plantas assintomáticas coletadas 5 dias após o transplante para ambiente protegido. B) 1 a 6 – Amostras de plantas assintomáticas coletadas 70 dias após o transplante..... 101

**Figura 3.** Gel de eletroforese apresentando especificidade na reação múltipla para *Didymella bryoniae*. 1 – 100 pb ladder; C<sup>+</sup> – Isolado de *Didymella bryoniae* (controle positivo); C<sup>-</sup> controle negativo; A) 1 a 10 – Planta com tecido sintomático; 11 a 20 – 5cm acima do tecido sintomático; B) 1 a 10 - 15 cm acima do tecido sintomático; 11 a 20 – 30 cm acima do tecido sintomático..... 113

**Figura 4.** Incidência e severidade da podridão gomosa em plantas de meloeiro nobre em cultivo protegido..... 114

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I. TRANSMISSÃO DE <i>Didymella bryoniae</i> EM PEPINO PARTENOCÁRPICO SEMENTE-PLANTA.....</b>	<b>1</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>4</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>6</b>
2.1. Infecção de pepino partenocárpico por <i>D. bryoniae</i> para a investigação de transmissão sementes-planta.....	6
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>9</b>
3.1. Transmissão de <i>D. bryoniae</i> sementes-plantas.....	9
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>15</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>16</b>
<b>CAPÍTULO II. DETECÇÃO DE <i>Didymella bryoniae</i> EM SEMENTES DE PEPINO PARTENOCÁRPICO POR PCR MULTIPLEX.....</b>	<b>19</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>20</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>21</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
2.1. Extração de DNA.....	24
2.2. Reação de PCR Multiplex.....	25
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>32</b>
<b>CAPÍTULO III. INFECÇÃO LATENTE DE <i>Didymella bryoniae</i> EM PLANTA DE PEPINO PARTENOCÁRPICO.....</b>	<b>36</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>37</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>38</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
2.1. Obtenção das plantas de pepino partenocárpico.....	41
3.1. Extração de DNA total.....	42

4.1. Reação de PCR Multiplex.....	43
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
3.1. Infecção latente em hipocótilo assintomático de plântulas de pepino partenocárpico originadas de sementes não-tratadas e tratadas com fungicida.....	44
<b>4.CONCLUSÕES.....</b>	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>
<b>CAPÍTULO IV. CONTROLE QUÍMICO DA PODRIDÃO GOMOSA EM PEPINO PARTENOCÁRPICO.....</b>	<b>53</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>54</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>56</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>60</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>64</b>
3.1. Ensaio experimental na primavera-verão.....	64
3.2. Ensaio experimental no verão-outono.....	66
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>
<b>CAPÍTULO V. EFEITO DA ENXERTIA NO CONTROLE DA PODRIDÃO GOMOSA EM PEPINO PARTENOCÁRPICO.....</b>	<b>78</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>79</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>80</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>81</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>83</b>
2.1. Ensaio experimental em casa-de-vegetação.....	83
2.1.1. Obtenção do isolado de <i>Didymella bryoniae</i> .....	83
2.1.2. Produção de mudas.....	83
2.1.3. Inoculação.....	84
2.1.4. Delineamento experimental.....	85
2.1.5. Avaliações e análise dos resultados.....	86
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>87</b>
3.1. Efeito da enxertia de plantas de pepino partenocárpico em plantas de abóbora Shelper no controle da podridão gomosa em casa-de-vegetação.....	87
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>92</b>

<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>93</b>
<b>CAPÍTULO VI INFECÇÃO LATENTE E SISTÊMICA DE <i>Didymella bryoniae</i> EM MELOEIRO NOBRE EM AMBIENTE PROTEGIDO.....</b>	<b>96</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>97</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>98</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>99</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>101</b>
2.1. Período e localização dos experimentos.....	101
2.2. Aquisição das sementes de melão .....	101
2.3. Produção das plantas de meloeiro nobre.....	101
2.3.1. Investigação da infecção latente a partir do colo assintomático de plântulas de meloeiro nobre.....	102
2.3.2. Investigação da infecção latente do patógeno através da extração de DNA total em plantas assintomáticas a partir de quatro segmentos do caule.....	103
2.3.3. Investigação da infecção sistêmica do patógeno através da extração de DNA total em plantas sintomáticas.....	103
3.1. Avaliações.....	104
4.1. Extração de DNA total.....	105
5.1. Reação de PCR Multiplex.....	107
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>107</b>
3.1. Investigação do período de latência de podridão gomosa em meloeiro nobre...	
3.2. Infecção Latente.....	107
3.2.1. Investigação da infecção latente a partir do colo assintomático de plântulas de meloeiro nobre.....	107
3.2.2. Investigação da infecção latente do patógeno a partir do colo assintomático de plantas de meloeiro nobre em cultivo protegido.....	109
3.3. Infecção Sistêmica.....	111
3.3.1. Investigação da infecção sistêmica do patógeno através da extração de DNA total em plantas sintomáticas.....	111
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>115</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>116</b>



## **CAPÍTULO I**

### **TRANSMISSÃO DE *Didymella bryoniae* SEMENTE-PLANTA EM PEPINO PARTENOCÁRPICO**

## RESUMO

Crestamento gomoso do caule causado por *Didymella bryoniae*, é uma das doenças mais importantes na cultura do pepino em ambiente protegido, causando podridões em caules e frutos. Associações sobre a transmissão do patógeno a partir de sementes para plântulas precisam ser comprovadas e esclarecidas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a transmissão de *D. bryoniae* das sementes de pepino partenocárpico híbrido 'Hokushin' para as plantas. Para tanto, avaliou-se a transmissão do patógeno para plantas por meio dos testes de sintomas em plantas em substrato comercial a base de casca carbonizada de *Pinus* sp. e solo:areia em casa-de-vegetação, e em substrato ágar-água e vermiculita em câmara de incubação. Para os testes em casa-de-vegetação a porcentagem de transmissão de *D. bryoniae* foi de 7,0 % e 11,5 % para o substrato comercial e solo: areia, respectivamente. Nos testes em câmara de incubação, a transmissão foi de 3,5 % e 1,5 % em substrato ágar-água e vermiculita, respectivamente. A transmissão do patógeno *D. bryoniae* por sementes de pepino foi experimentalmente demonstrada pelo teste de sintomas em mudas *in vitro* e *in vivo*, com maior incidência nas plantas transplantadas para o substrato solo:areia.

**Palavras-chave:** Podridão gomosa. *Cucumis sativus*. Patologia de sementes.

## ABSTRACT

Gummy stem blight caused by *Didymella bryoniae*, is one of the most important diseases on cucumber in greenhouse, causing rot in stems and fruits. Associations on the the transmission of the pathogen from seeds to seedlings need to be verified and clarified. The objective of this study was to evaluate the transmission of *D. bryoniae* seeds of parthenocarpic cucumber hybrid "Hokushin" to plants. For this, we evaluated the transmission of disease to plants through the tests of symptoms in plants in commercial substrate the base shell carbonized *Pinus* sp. and soil: sand in-house vegetation, substrate and water-agar and vermiculite in an incubation chamber. For the tests in a green house, the percentage of transmission of *D. bryoniae* was 7.0% and 11.5% for the commercial substrate and soil: sand, respectively. In the tests where the incubation chamber, the transmission was 3.5% and 1.5% water agar substrate and vermiculite, respectively. The transmission of the pathogen *D. bryoniae* by cucumber seeds was experimentally demonstrated by test symptoms in seedlings 'in vitro' and 'in vivo', focusing on plants transplanted to substrate soil:sand.

**Keywords:** Rot gummy. *Cucumis sativus*. Seed pathology.

## 1. INTRODUÇÃO

O pepino partenocárpico (*Cucumis sativus* L.) pertence à família das cucurbitáceas. A Índia é o seu centro de origem, sendo introduzido posteriormente na China, nas Filipinas e Ilhas Formosas, podendo ser cultivado tanto em condições de campo como em cultivo protegido (FILGUEIRA, 2003). A Ásia é a maior produtora de pepino no mundo, sendo responsável por 73 % da produção mundial e a China, produz individualmente 42 % desta produção. Na Europa, se cultiva basicamente variedades e híbridos ginóicas partenocárpicas, obtendo-se altas produtividades em ambiente protegido (FONTES, 2005).

Aumentos de produtividade em ambiente protegido têm influenciado positivamente no desenvolvimento, rendimento e na qualidade comercial dos frutos de pepineiro, trazendo grandes benefícios, principalmente aos pequenos e médios produtores, pelo cultivo intensivo, alta produtividade e possibilidade de produzir em épocas que normalmente seriam impróprias para cultivo (GUSMÃO; GUSMÃO, 2005).

Apesar do sucesso econômico alcançado, várias doenças podem afetar a produção das cucurbitáceas, em especial, a cultura do pepineiro. Entre elas, a podridão gomosa, causada por *Didymella bryoniae* (Auersw) Rehm, (sinons. *Mycosphaerella citrullina* (C.O. Sm.) Grossenb. – *Mycosphaerella melonis* (Pass.) W.F. Chiu & J.C. Walker), anamorfo *Ascochyta cucumis* Fautrey ; Roum [= *Phoma cucurbitacearum* (Fr.: Fr.) Sacc.].

*D. bryoniae* tem uma ampla gama de espécies hospedeiras em cucurbitáceas incluindo pepino, melão (*Cucumis melo* L.), melão oriental (*Cucumis melo* var. *makuwa* Makino), abóbora (*Cucurbita pepo* L.) e melancia (*Citrullus vulgaris* Shrad.), causando uma variedade de sintomas como manchas foliares, cancro da haste, murcha e podridão negra em frutos. Apesar de sua ocorrência generalizada e importância, muito pouco se sabe sobre a epidemiologia da podridão gomosa (LEE et al., 1984).

Além disso, *D. bryoniae* pode sobreviver em restos de cultura, podendo servir como fonte de inóculo no campo (KEINATH, 2002), mantendo sua viabilidade na forma de micélio dormente (KUROZAWA et al., 2005) por tempo até maior que um ano (VAN STEEKENBURG, 1983). Este patógeno pode se manter também em sementes infectadas, localizando-se superficialmente ou no seu interior, no perisperma e tecidos cotiledonares (LEE et al., 1984; SUDISHA et al., 2006).

Segundo Menten (1995), a importância de patógenos associados às sementes não está apenas na possibilidade do desenvolvimento da doença na fase inicial e subsequente da cultura, mas também na introdução de inóculo em áreas não infestadas.

Na Região Norte do Paraná, tem sido observado, em cultivos protegidos de pepino partenocárpico, epidemias de podridão gomosa, com o inóculo primário possivelmente originado de sementes (VIDA et al.; 2004; VERZIGNASSI et al., 2004). Danos diretos de *D. bryoniae* às sementes não têm sido relatados na literatura. Embora sejam poucos os trabalhos que trataram da associação e transmissão de *D. bryoniae* por sementes de cucurbitáceas cultivadas, estes têm demonstrado ocorrências em elevadas taxas, mais de 40% de transmissão em pepino, abóbora (LEE et al., 1984) e melão (SUDISHA et al., 2006) e transmissão para plantas de 28 a 52% a partir de lotes de sementes de meloeiro nobre (GASPAROTTO et al., 2009).

Devido à grande quantidade de sementes de cucurbitáceas produzidas no Brasil e também importadas e a capacidade de *D. bryoniae* estar associado a elas, torna-se importante a disponibilidade de informações sobre a qualidade sanitária desse material de plantio, como também quantificar a transmissão do patógeno de sementes para plântulas.

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou avaliar a transmissão de *D. bryoniae* das sementes de pepino partenocárpico híbrido 'Hokushin' para as plantas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Infecção de pepino partenocárpico por *D. bryoniae* para a investigação de transmissão de semente-planta

Para instalação do experimento utilizou-se lote (1L/022-11) de sementes de pepino partenocárpico híbrido 'Hokushin' adquirido em estabelecimento de comercialização de sementes em Maringá, PR. A avaliação da transmissão do patógeno das sementes para as plantas foi realizada em Janeiro de 2012 em casa-de-vegetação (teste de transmissão no substrato a base de casca de *Pinus* sp. carbonizada e solo:areia) e em câmara de incubação (teste de transmissão em ágar-água e em vermiculita).

No teste de transmissão em plantas em substrato a base de casca de *Pinus* sp. carbonizada seguiu-se a metodologia descrita por Gasparotto et al. (2009). Utilizou-se o substrato comercial a base de casca de *Pinus* sp. carbonizada, autoclavado duas vezes a 120 °C, a 1 atm, durante duas horas, com intervalo de autoclavagem de 24 horas. Após um período de descanso de 72 horas, o substrato foi distribuído em bandejas de poliestireno expandido de 72 células. Em seguida, realizou-se a semeadura de 400 sementes do híbrido 'Hokushin' considerado de alta susceptibilidade à *D. bryoniae*. As bandejas foram mantidas em casa-de-vegetação semi-climatizada.

Quando as plântulas emitiram a primeira folha definitiva, aproximadamente nove dias após a emergência, metade das plantas foram transferidas para sacos plásticos contendo 350 mL do substrato solo:areia (1:1 v/v), desinfestado por autoclavagem. Na transferência para o novo substrato, as plantas foram retiradas de forma alternada nas fileiras da bandeja de isopor. Tanto as plantas que permaneceram nas bandejas, quanto as que foram transferidas para o substrato solo:areia, foram mantidas em casa-de-vegetação semi-climatizada (Figura 1). As irrigações foram realizadas, diariamente, com água de torneira.

Anteriormente e após a transferência, durante 60 dias, as plantas de ambos os substratos foram examinadas a cada cinco dias, quanto à presença de sintomatologia de podridão gomosa (sintomas da doença e sinais do patógeno). As mudas com sintomas foram descartadas. Esse procedimento foi adotado para evitar disseminação de inóculo de plantas doentes para plantas saudáveis.



**Figura 1.** Plantas de pepino partenocárpico em substrato comercial (A) e em substrato solo:areia lavada (B) em casa-de-vegetação semi-climatizada.

As avaliações foram realizadas a cada cinco dias do início dos primeiros sintomas até 60 dias após a emergência e os resultados foram expressos em porcentagem de plantas apresentando qualquer sintomatologia de podridão gomosa, em qualquer órgão aéreo da planta nos dois substratos.

A incidência da podridão gomosa em cada tratamento foi avaliada por meio da contagem do número de plantas com sintomatologia da doença em cada avaliação, e expressa pela porcentagem de plantas doentes em relação ao total de plantas avaliadas em cada substrato.

Para o teste de transmissão em plantas em ágar-água foram utilizados tubos de ensaio de 18x180 mm. Adicionou-se em cada tubo 10 mL de meio ágar-água a 2 % e posteriormente, os tubos foram autoclavados a 120 °C, a 1 atm, durante vinte minutos. Duzentas sementes de pepino partenocárpico do híbrido 'Hokushin' foram desinfetadas superficialmente com uma solução a 2% de hipoclorito de sódio com 2,0 a 2,5% de cloro ativo durante cinco minutos e lavadas por três vezes com água destilada esterilizada. Com auxílio de pinça esterilizada colocou-se em cada tubo uma semente. As sementes nos tubos de ensaio foram incubadas por 45 dias sob ciclos alternados de 12 horas de luz fluorescente e 12 horas de escuro, à temperatura de  $24 \pm 2$  °C. As plantas foram avaliadas a cada cinco dias durante 45 dias quanto à sintomatologia de *D. bryoniae*. Em caso de dúvidas na diagnose, as plantas foram submetidas à câmara úmida e posteriormente observadas ao microscópio óptico para visualização de estruturas fúngicas. Os resultados foram expressos em porcentagem de plantas com sintomas e/ou sinais do patógeno.

Para o teste de sintomas em plantas em vermiculita, efetuou-se a lavagem do substrato com água para a retirada das impurezas. Após lavagem, o substrato foi colocado em tubos de ensaio de 18x180 mm, seguido de autoclavagem à 120 °C, a 1 atm, durante vinte minutos. Duzentas sementes de pepino partenocárpico do híbrido 'Hokushin' foram desinfetadas superficialmente e lavadas em água, como descrito anteriormente. Com auxílio de pinça esterilizada transferiu-se para cada tubo uma semente. As sementes nos tubos de ensaio foram incubadas por 45 dias sob ciclos alternados de 12 horas de luz fluorescente e 12 horas de escuro, à temperatura de  $24 \pm 2$  °C. As plantas foram avaliadas a cada cinco dias, durante 45 dias, como descrito anteriormente. Em caso de dúvidas na diagnose, as plantas foram submetidas à câmara úmida, posteriormente observadas ao microscópio óptico para visualização de estruturas fúngicas. Os resultados foram expressos em porcentagem de plantas com sintomas e/ou sinais do patógeno.



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Transmissão de *Didymella bryoniae* sementes-plantas

Os resultados demonstraram que para pepino partenocárpico, híbrido 'Hokushin', houve transmissão de *D. bryoniae* de sementes para plantas empregando os substratos à base de casca de *Pinus* sp. carbonizada e solo:areia em condições de casa-de-vegetação. As porcentagens de transmissão de *D. bryoniae* foram de 7,0 % e 11,5 % para as plantas em substrato à base de casca de *Pinus* sp. carbonizada e em solo:areia, respectivamente, sessenta dias após emergência (DAE) (Tabela 1).

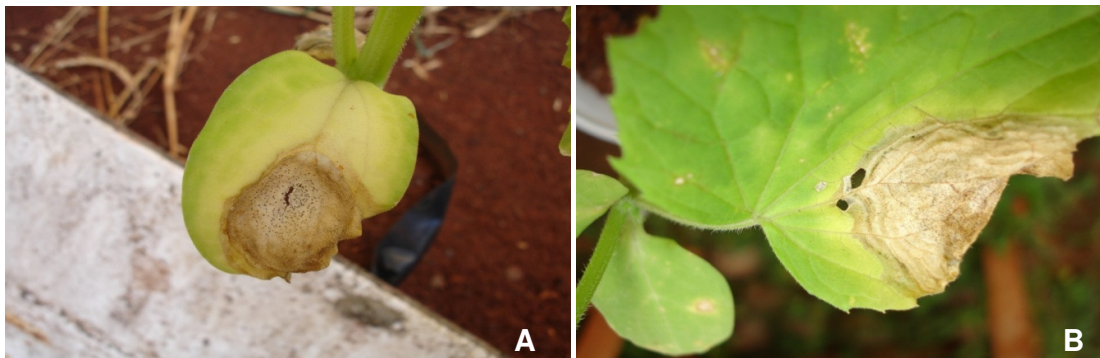
**Tabela 1.** Transmissão de *Didymella bryoniae* (%) de sementes para plantas de pepino partenocárpico híbrido 'Hokuskin' em substrato a base de casca de *Pinus* sp. carbonizada e solo:areia em casa-de-vegetação

Dias após emergência (DAE)	Plant Max HF <sup>®</sup> (%)*	Solo:Areia (%)*
30	0,0	1,0
35	0,0	3,0
40	0,0	1,5
45	0,0	2,0
50	2,5	1,5
55	2,0	0,5
60	2,5	2,0
<b>Total (%)</b>	<b>7,0</b>	<b>11,5</b>

\*Valores referentes a amostra de 200 sementes para cada substrato.

No substrato solo:areia observou-se os primeiros sintomas de podridão gomosa aos 30 dias após emergência. Os primeiros sintomas apareceram em folhas cotiledonares ou nas primeiras folhas definitivas. Inicialmente, o tecido lesionado apresentava aspecto aquoso, para em seguida ocorrer à necrose. Essa necrose iniciava no bordo foliar, com coloração marrom-claro e progredia em direção ao centro do limbo, com formato arredondado. Em fase adiantada de desenvolvimento, as manchas apresentavam bordo de coloração marrom-escuro e ocorria formação de grande quantidade de estruturas reprodutivas (picnídios e ascocarpos), observados visualmente e ao microscópio óptico (Figura 2). Sintomatologia de podridão

gomosa em cucurbitáceas semelhantes a esta foi relatada por Wiant (1945), Chiu; Walker (1949), Kurozawa et al. (2005) e Sudisha et al. (2006).



**Figura 2.** Plantas de pepino partenocárpico híbrido ‘Hokushin’ apresentando sintomas e sinais de podridão gomosa nas folhas cotiledonares (A) e primeira folha definitiva (B).

Lee et al. (1984) também observaram sintomas iniciais de podridão gomosa em cotilédones de pepino que apresentaram-se com pequenas lesões encharcadas, que depois tornaram-se irregulares e estenderam-se para hipocótilo e primeiras folhas verdadeiras. As manchas nas folhas de forma irregular apresentaram-se, inicialmente, de coloração cinza-esverdeado e sete dias após a inoculação tornaram-se marrom-escuro. Sob condições de umidade excessiva, os sintomas desenvolveram-se gradualmente da parte inicialmente infectada para a infecção de outras partes da planta.

Em substrato comercial, os primeiros sintomas de podridão gomosa nas plantas de pepino foram observados aos 50 dias após emergência, com a porcentagem de transmissão de 2,5 %. Aos 55 e 60 dias após emergência a porcentagem de transmissão foi de 2,0 e 2,5 %, respectivamente. A porcentagem final de transmissão neste substrato, considerando todas as plantas com incidência de podridão gomosa, foi de 7,0 % (Tabela 1).

Para as plantas que foram transplantadas para solo:areia e permaneceram neste substrato até aos 60 dias após a emergência, a porcentagem de transmissão foi de 1,0 %; 3,0 %; 1,5 %; 2,0 %; 1,5 %; 0,5 %; 2,0 %, aos 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 dias após emergência, respectivamente. Em solo:areia o estresse causado nas plantas pelo transplante ou alteração nutricional pode ter contribuído para maior susceptibilidade do hospedeiro e manifestação do patógeno. Segundo Vida et al. (2004) existe associação entre o aparecimento dos primeiros sintomas de podridão gomosa em plantas de melão nobre após o transplante para estufa plástica e os estresses pós-transplante.

Vida et al. (2007) constataram evidência de transmissão de *D. bryoniae* por meio de dois lotes de sementes do híbrido de meloeiro nobre Bonus II e um do híbrido Sunrise para mudas transplantadas para ambiente protegido. Os autores observaram que a incidência de podridão gomosa foi de 8,4; 7,1 e de 5,7%,

Gasparotto (2010) constatou no teste de sintomas em plântulas, índices de plantas com sintomatologia de podridão gomosa mais altos em substrato comercial do que em solo:areia, registrando-se transmissão de *D. bryoniae* para plantas de meloeiro que variam de 12,5 a 32 %. De forma contrária aos resultados obtidos neste trabalho, as porcentagens inferiores de plantas com sintomatologia de podridão gomosa em substrato comercial a base de casca de *Pinus* sp. carbonizada (Plant Max HF<sup>®</sup>), possivelmente se deve ao fato de que *D. bryoniae* esteja em infecção latente nas plantas de pepino.

A mudança do estadio de infecção latente para o estadio de atividade com manifestação de sintomas, provocado por exposição do hospedeiro a estresse, foi constatado para outros patógenos (STANOSZ et al., 2001; SULTANA et al., 2009; KLINGELFUSS; YORINORI, 2001). O desbalanço nutricional é outro fator que pode contribuir para uma mudança na predisposição do hospedeiro (BEDENDO, 1995; JARVIS, 1993; ZAMBOLIM et al., 2000).

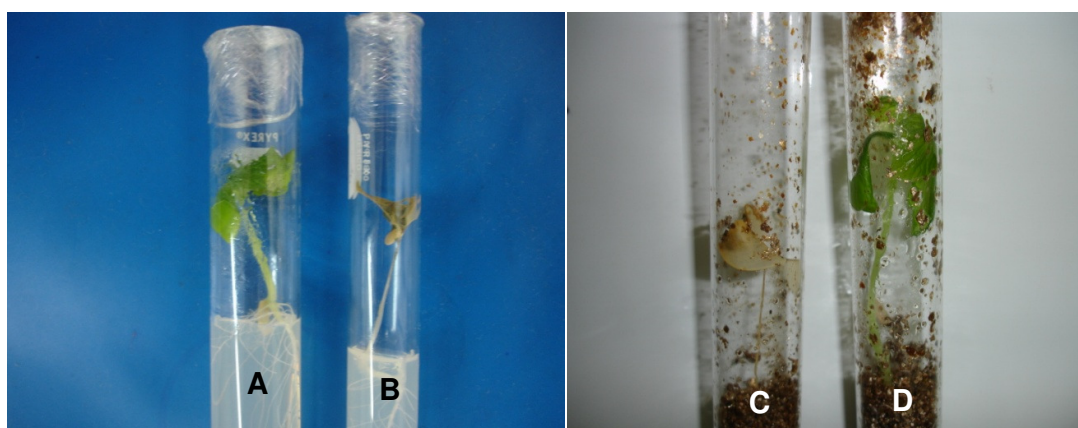
Em teste de sintomas em plântulas, Verzignassi et al. (2004) comprovaram que *D. bryoniae* estava associada a sementes importadas de pepino partenocárpico híbrido 'Hokushin' com sintomas da doença 21 dias após a emergência das plântulas, especialmente em condições de câmara úmida. Análises de sementes importadas de pepino partenocárpico, realizadas no Laboratório de Fitopatologia, do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá, têm revelado transmissão de *D. bryoniae* de até 3,5 %, 19,3 % e 35 % para os híbridos Natsubayashi, 'Hokushin' e Tsuyataro, respectivamente.

No Brasil, grande parte das sementes de híbridos de hortaliças cultivadas em ambiente protegido é importada, mas são poucas as informações sobre a qualidade sanitária do lote de sementes. Diante disso, a análise de sanidade de sementes é de grande importância, fornecendo informações sobre os níveis de incidência do patógeno, que servirão como orientação na tomada de decisão sobre métodos de controle, quando os lotes de sementes chegam ao campo (BRASIL, 2009).

Em condições 'in vitro', para os substratos ágar-água e vermiculita também se observou a transmissão de *D. bryoniae* de sementes para plantas de pepino partenocárpico, híbrido 'Hokushin'. Os sintomas nas plântulas iniciaram-se nas folhas cotiledonares,

apresentando-se lesões aquosas que depois tornaram-se irregulares e estenderam para hipocótilo, tornando-se posteriormente necróticas. Os sintomas de *D. bryoniae* foram confirmados ao final do experimento, por meio de observações ao microscópio óptico das estruturas fúngicas.

A manifestação dos sintomas de podridão gomosa ocorreu aos 40 DAE nos substratos ágar-água e vermiculita, em porcentagens de 1,5 e 0,5 %, respectivamente. Aos 45 DAE, as porcentagens de plantas sintomáticas foram de 2,0 e 1,0 para o meio de cultivo ágar-água e vermiculita, respectivamente (Tabela 2).



**Figura 3.** Planta de pepino partenocárpico híbrido ‘Hokushin’ em meio ágar-água (A) e em vermiculita (D). Planta de pepino partenocárpico híbrido ‘Hokushin’ com sintomas de podridão gomosa em meio ágar-água (B) e em vermiculita (C).

**Tabela 2.** Transmissão de *Didymella bryoniae* (%) de sementes para plantas de pepino partenocárpico híbrido ‘Hokuskin’ nos substratos ágar-água e vermiculita em câmara de incubação

Dias após emergência (DAE)	Ágar-água (%)*	Vermiculita (%)*
30	0,0	0,0
35	0,0	0,0
40	1,5	0,5
45	2,0	1,0
<b>Total (%)</b>	<b>3,5</b>	<b>1,5</b>

\*Valores referentes a amostra de 200 sementes para cada substrato.

Gasparotto (2010), constatou no teste de transmissão em substrato ágar-água, índices de infecção de *D. bryoniae* variando de 2 a 3 %. Estes valores são semelhantes aos encontrados neste trabalho, para pepino partenocárpico. Por outro lado, a associação do patógeno de sementes-plântulas de pepino partenocárpico em meio contendo vermiculita, foi relativamente baixa, se comparado com trabalho desenvolvido com meloeiro nobre pelo mesmo autor que, obteve índices de *D. bryoniae* associado a sementes de melão variando de 6 a 14 %.

Diferente dos resultados obtidos neste trabalho, Sudisha et al. (2006), observaram alta taxa de transmissão de *D. bryoniae* das sementes de meloeiro nobre para as plântulas. Estes autores, utilizando-se do teste de sintomas em ágar-água, com vários híbridos de meloeiro nobre, constataram a presença de sintomatologia de *D. bryoniae* em hipocótilos e em cotilédones, com transmissão semente-plântula de até 16 % para presença do patógeno. Em teste, em condições de campo, também observaram a transmissão de até 40 % de *D. bryoniae*.

Lee et al. (1984), obtiveram no teste de sanidade em papel filtro porcentagem de incidência de *D. bryoniae* variando de 0,5 a 38 %. No teste com ágar sólido obtiveram índices de *D. bryoniae* menores de 1,0 a 19,0 %. Os mesmos autores ainda ressaltam que, no teste de transmissão sementes-plântulas, 80 % das plântulas de pepino apresentaram os primeiros sintomas de *D. bryoniae* no hipocótilo e 38 % no cotilédones, sendo que em muitas destas mudas os sintomas na base do hipocótilo e cotilédones desenvolveram-se simultaneamente.

Os resultados deste trabalho mostraram que em condições 'in vitro' houve menores porcentagens de transmissão de *D. bryoniae*, mostrando a menor sensibilidade do método em câmara de incubação em relação ao experimento em casa-de-vegetação, para a constatação do patógeno em sementes de pepino partenocárpico. Possivelmente, este fato se deveu à menor exposição das plantas a estresse. Vida et al. (2007) citam que existe evidência de relação direta entre aparecimento de sintomas de podridão gomosa e estressamento de plantas de melão.

Outro aspecto a ser considerado, é que alguns tipos de substrato tem favorecido o controle de doenças. No trabalho realizado por Gasparotto et al. (2009), utilizando-se o teste de sintomas em plântulas no substrato areia, não foi possível observar visualmente sintomas de *D. bryoniae* associado a sementes de meloeiro nobre dos híbridos Sunrise, Bonus II e Prince Hakucho.

Verzignassi et al. (2004), utilizando também o teste de sintomas em plântulas, no substrato areia, não constataram a presença de *D. bryoniae* associado a sementes e pepino

japonês 'Hokushin'. No entanto, ao final do teste, estes autores coletaram caules de plantas assintomáticas, submeteram-nos às condições de câmara úmida, a 30 °C e constataram que em alguns segmentos de caule ocorreu a formação de picnídios e ascas com ascósporos das formas teleomórfica e anamórfica do patógeno, abundantemente.

Segundo Moorman (2003), a modificação do meio de cultivo, com a substituição do solo por recipientes contendo outros tipos de substratos tem favorecido o controle de doenças. O mesmo autor diz que, materiais como areia, vermiculita, lã de rocha, perlita e poliestireno expandido são livres de patógenos. Estes materiais podem ser utilizados na composição de meios de cultivo com características físicas desejáveis para o desenvolvimento saudável das raízes. Assim, pode-se considerar que o substrato vermiculita possivelmente favoreceu uma menor incidência de *D. bryoniae* nas plântulas de pepino partenocárpico.

A natureza global da produção e do comércio internacional de sementes aumentou significativamente o risco de disseminação de patógenos transmitidos pela semente (WALCOTT, 2008). Enquanto restos de cucurbitáceas associados com *D. bryoniae* frequentemente servem como uma fonte de inóculo no campo (KEINATH, 2002), a infecção de mudas em estufas tem sido atribuída às sementes contaminadas (BROWN et al, 1970; LEE et al, 1984).

Além dos problemas de sanidade, patógenos associados às sementes podem promover a redução da população de plantas, afetando a germinação e o vigor das mesmas e o desenvolvimento de epidemias (MENTEN, 1991).

Assim, sendo o patógeno *D. bryoniae* transmitido por semente, a utilização de sementes sadias para a produção de mudas de espécies de curcubitáceas é essencial para que se tenha, desde o início do cultivo, um estande adequado, ausência de doença, além de uma boa produtividade.

#### 4. CONCLUSÃO

Por meio do teste de sintomas em plântulas, em condições '*in vivo*' e '*in vitro*', constatou-se que *D. bryoniae* é transmitida de sementes para mudas de pepino partenocárpico.

O teste de sintomas em plântulas em substrato solo:areia apresentou maior sensibilidade para analisar a qualidade de sementes importadas de pepino partenocárpico.

## REFERÊNCIAS

- BEDENDO, I. P. Ambiente e Doença. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, F.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos**. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.331-341.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária, 2009. Cap. 9 Teste de Sanidade de Sementes (Regras para Análise de sementes), 202p.
- BROWN, M. E.; HOWARD, E. M.; KNIGHT, B. C. Seed-borne *Mycosphaerella melonis* on cucumber. **Plant. Pathology**, v.19, n.4, p.198, 1970.
- CHIU, W. F.; WALKER, J. C. Morphology and variability of the cucurbit back rot fungus. **Journal of Agricultural Research**, v.78, p.81-102, 1949.
- FILGUEIRA, F.A.R. **Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia Moderna na Produção e Comercialização de Hortaliças**. Editora UFV, 2003. 412p.
- FONTES, P. C. R. **Olericultura: Teoria e prática**. 1.ed. Viçosa, MG; 2005. 486p.
- GASPAROTTO, F.; VIDA, J. B.; TESSMANN, D. J.; BONALDO, S. M.; AGUIAR, R. L.; PENHARBEL, M. P. Eficiência de métodos para de *Didymella bryoniae* associado a sementes de híbridos de meloeiros nobres. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.31, n.3, p.397-402, 2009.
- GASPAROTTO, F. **Transmissão e controle de *Didymella bryoniae* em meloeiro nobre**. Maringá, 2010. 169p. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Estadual de Maringá.
- GUSMÃO, M. T. A.; GUSMÃO, S. A. L. Desenvolvimento de cultivares de pepino sob ambiente protegido, nas condições da Amazônia Oriental. **Anais. Congresso Brasileiro de Olericultura**. 2005. 4p.
- JARVIS, W.R. **Managing diseases in greenhouse crops**. St. Paul. APS Press. 1993.
- KEINATH, A. P. Survival of *Didymella bryoniae* in buried watermelon vines in South Carolina. **Plant Disease**, v.86, p.32-38, 2002.
- KLINGELFUSS, L. H.; YORINORI, J. T. Infecção latente de *Colletotrichum truncatum* e *Cercospora kikuchii* em soja. **Fitopatologia Brasileira**. v.26, n.2, p.158-164, 2001.
- KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A.; REZENDE, J. A. M. Doenças das cucurbitáceas in: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. São Paulo, ed. Agronômica Ceres, 4ªed. v.2, p.293-310, 2005.
- LEE, H., MATHUR, S. B., NEERGAARD, P. Detection and location of seed-borne inoculum of *Didymella bryoniae* and its transmission in seedlings of cucumber and pumpkin. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.109, p.301-308, 1984.



MENTEN, J. O. M. Prejuízos causados por patógenos associados às sementes. In: MENTEN, J. O. M. (Ed.). **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. Piracicaba: Esalq, p.115-136, 1991.

MENTEN, J. O. Prejuízos ocasionados por patógenos às sementes. In: Menten, J. O. M. (Org.) **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. 1<sup>a</sup> ed., Piracicaba, Ciba agro, p.115-136, 1995.

MOORMAN, G. (2003). Cultural control of Plant Diseases. In: R. N. Trigiano, M. T. Windham, & A. S. Wiindham (Eds.), **Plant Pathology: Concepts and Laboratory Exercises** (pp. 530–540). CRC Press. doi:0-203-58517-8

STANOSZ, G. R.; BLODGETT, J. T.; SMITH, D. R.; KRUGER, E. L. Water stress and *Sphaeropsis sapinea* as a latent pathogen of red pine seedlings. **New Phytologist**, v.149:p.531–538, 2001.

SUDISHA, J.; NIRANJANA, S. R.; UMESHA, S.; PRAKASH, H. S., SHEKAR SHETTY, H. Transmission of seed-borne infection of muskmelon by *Didymella bryoniae* and effect of seed treatments on disease incidence and fruit yield. **Biological Control**, v.37, p.196-205, 2006.

SULTANA, N.; AZEEM, T.; GHAFAR, A. Location of seed-borne inoculums of *Macrophomina phaseolina* and its transmission in seedlings of cucumber. **Pakistan Journal of Botany**, v.41, n.5: p.2563-2566, 2009.

VAN STEEKELENBURG, N. A. M. Epidemiological aspects of *Didymella bryoniae*, the case of stem and fruit of cucumber. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 89, p.75-86, 1983.

VERZIGNASSI, J. R; VIDA, J. B.; GASPAROTTO, F.; CORTEZ, G. L. S.; LORENZETTI, E. R.; FARIA, G. de S.; TESSMANN, D. J.; SEVERINO, J. J. Método do palito para inoculação de *Didymella bryoniae* em melão nobre e pepino "partenocárpico". **Fitopatologia Brasileira**, v.29 (S), 2004, p.154.

VIDA, J.B., TESSMANN, D.J., ZAMBOLIM, L., VERZIGNASSI, J.R.; BRANDÃO FILHO, J.U.T. Controle da podridão gomosa em melão rendilhado em cultivo protegido por sanitização de ferramenta de poda. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n. 6, p.626-630. 2004.

VIDA, J. B.; FERNADES, J.; OLIVEIRA, R. R. Doenças em cultivo protegido: situação atual e perspectivas. In: ZAMBOLIM, L.; LOPES, C. A.; PICANÇO, M. C.; COSTA, H. (Org.). **Manejo integrado de doenças e pragas: hortaliças**. Viçosa: Universo, 2007. p.91-114.

ZAMBOLIM, L., COSTA, H., LOPES, C.A. ; VALE, F.X.R. Doenças de hortaliças em cultivo protegido. In: Zambolim, L., Vale, F.X.R., Costa, H. (Eds.) **Controle de doenças de plantas-hortaliças**. v.1. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 2000. pp.373-407.

WALCOTT, R. R. **Integrated pest management of bacterial fruit blotch of cucurbits. in Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria**. (Eds. A. Ciancio and K.G. Mukerji), Springer, Netherlands. p.191-209. 2008.

WIANT, J.S. *Mycosphaerella* black rot of cucurbits. **Journal of Agricultural Research**, v.71, p.193-213, 1945.

## **CAPÍTULO II**

### **DETECÇÃO DE *Didymella bryoniae* EM SEMENTES DE PEPINO PARTENOCÁRPICO POR PCR MULTIPLEX**

## RESUMO

Epidemias da doença podridão gomosa, têm causado perdas significativas em cucurbitáceas, principalmente na cultura do pepino, tornando-se uma das doenças mais importantes em ambiente protegido. Este patógeno pode reduzir a capacidade germinativa de sementes, causar a morte de plântulas ou ser transmitido das sementes para plantas. O uso de sementes isentas do patógeno tem sido um dos principais meios de controle dessa doença. O patógeno não tem sido detectado em sementes de cucurbitáceas empregando métodos convencionais para análise sanitária. Frequentemente resultados falsos negativos são encontrados para lotes de sementes infectados com o patógeno. Assim, o objetivo desse trabalho foi utilizar o método de PCR Multiplex para detectar *D. bryoniae* associado a sementes comerciais de pepino partenocárpico, híbrido 'Hokushin'. Para isso avaliou-se um lote de sementes dividido em três amostras de 50, 100 e 200 sementes, respectivamente, sob três condições: sem embebição em água, embebidas por 24 e 48 horas. Para reação de PCR Multiplex utilizou-se oligonucleotídeos 'primers' específicos para detecção de *D. bryoniae*. Em todas as sub-amostras nas três quantidades de 50, 100 e 200 sementes sem embebição em água, constatou-se a associação de *D. bryoniae*. Nas três amostras de sementes, previamente embebidas em água por 24 e 48 horas, houve uma diminuição no número de respostas positivas para a detecção do patógeno. Evidencia-se que a embebição influenciou negativamente no processo de extração de DNA total. A detecção qualitativa por meio da técnica de PCR Multiplex mostra-se como uma nova opção, rápida e sensível para a detecção de *D. bryoniae* associado às sementes de pepino partenocárpico.

**Palavras-chave:** *Cucumis sativus*. Podridão gomosa. Patologia de sementes.

## ABSTRACT

Epidemics of gummy stem blight of the disease, have caused significant losses in curcubitáceas mainly in cucumber crop, making it one of the most important diseases in a protected environment. This pathogen can reduce seed germination, seedling cause death or be transmitted to plant seeds. The use of pathogen-free seed has been a major means of disease control. The pathogen has not been detected in seeds of Cucurbitaceae employing conventional methods for sanitary analysis. Often false negative results are found for seed lots infected with the pathogen. The objective of this study was to use the method of "Multiplex PCR" to detect *D. bryoniae* associated with commercial seed parthenocarpic cucumber, hybrid 'Hokushin'. For this we assessed whether a batch of seeds divided into three samples of 50, 100 and 200 seeds, respectively, with three conditions: without soaking in water, soaked for 24 and 48 hours. For Multiplex PCR, we used primers specific for the detection of *D. bryoniae*. In all the three sub-samples of 50, 100 and 200 seeds without soaking in water, we found the association of *D. bryoniae*. In all three samples of seeds, previously soaked for 24 and 48 hours, there was a decrease in the number of positive responses for the detection of the pathogen. Evident that the imbibition negatively influenced the process of DNA extraction. Thus, the PCR technique Multiplex shows up as a new option for rapid and sensitive detection of *D. bryoniae* associated with Japanese cucumber seeds.

**Keywords:** *Cucumis sativus*, gummy rot, seed pathology.

## 1. INTRODUÇÃO

O pepineiro partenocárpico é uma das mais importantes hortaliças cultivadas em ambiente protegido nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil, gerando renda e bem estar social para pequenos agricultores (GUSMÃO; GUSMÃO, 2005).

Algumas variáveis da função produtividade, quando em níveis inadequados podem determinar a redução de rendimento, ou o insucesso do cultivo do pepineiro. Dentre essas variáveis, as doenças de natureza biótica têm sido motivo de preocupação para os plasticultores e produtores convencionais, sejam pelos elevados danos causados, muitas vezes inviabilizando a atividade, seja pela necessidade de adoção de medidas de controle, que muitas vezes resultam em baixa eficiência (RIZZO et al., 2003; VIDA et al., 2004).

As doenças, principalmente as de origem fúngica, constituem em importantes fatores que podem reduzir o rendimento da cultura do pepino, destacadamente a podridão gomosa, causada por *Didymella bryoniae* (Auersw) Rehm (sinons. *Mycosphaerella citrullina*; *Mycosphaerella melonis* – anamorfo *Ascochyta cucumis* Fautrey ; Roum. Na ausência de medidas de controle adequadas os danos podem chegar a 100% (VIDA et al., 2004).

A presença de patógenos fúngicos associados às sementes constitui em importante fator que pode reduzir o rendimento da cultura do pepino. Segundo Lee et al. (1984), a transmissão de *D. bryoniae* via sementes constitui na principal fonte de inóculo primário para a cultura do pepino, com associação do patógeno interna e externamente neste material de propagação. Walcott (2008) ressalta que, a natureza global da produção e o comércio internacional de sementes aumentaram significativamente o risco de disseminação de patógenos transmitidos pela semente.

Na Região Norte do Paraná, observações em cultivos protegidos de melão nobre e pepino partenocárpico têm constatado a ocorrência da podridão gomosa em alta severidade. Análises iniciais indicaram que, provavelmente, o inóculo primário foi originado das sementes (VIDA et al.; 2004, VERZIGNASSI et al., 2004).

A infecção de mudas de pepino em estufas por *D. bryoniae* tem sido atribuída às sementes contaminadas (BROWN et al, 1970;. LEE et al, 1984, SUDISHA et al., 2006), as quais constituem fonte de inóculo primário para sua disseminação a novos cultivos (LEE et al., 1984; SUDISHA et al., 2006; GASPAROTTO et al., 2009).

Em grande escala, produção de mudas de pepino em casa-de-vegetação é altamente favorável ao desenvolvimento da podridão gomosa, que começa a partir de um nível muito baixo de contaminação das sementes, evoluindo para o aumento da incidência do patógeno devido à densidade de plântulas transplantadas e uso de sistemas de rega aérea (KEINATH, 1996; KOIKE, 1997). Quando os sintomas da podridão gomosa são encontrados em mudas transplantadas de pepino, é muitas vezes tarde para os produtores realizarem a substituições das mudas (KEINATH, 1996) o que dificulta o controle da doença. Assim, a capacidade de detectar rapidamente o patógeno em mudas é importante para minimizar o impacto da podridão gomosa nas mudas quando transplantadas e na produção de cucurbitáceas.

O diagnóstico da podridão gomosa baseado em sintomas da doença pode ser difícil devido à influência de fatores bióticos ou abióticos. Análises por microscopia (KEINATH et al., 1995), ensaio blot (LEE et al., 1984) e dot-blot (KOCH; UTKHEDE, 2002) têm sido utilizados para fins de detecção, porém esses métodos são demorados e não apresentam sensibilidade.

Diante disso, têm se buscado técnicas moleculares de detecção e identificação de *D. bryoniae* baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), incluindo a PCR-imunoadsorção enzimática (PCR-ELISA) (SOMAI et al., 2002) e PCR em tempo real (HA et al., 2009) para proporcionar uma detecção rápida e sensível de *D. bryoniae*.

A utilização da técnica de PCR Multiplex, com dois conjuntos de oligonucleotídeos 'primers' específicos para a detecção de *D. bryoniae* em caules de plantas assintomáticas de meloeiro nobre, foi obtida com sucesso por Gasparotto et al. (2011). Koch e Utkhede (2004), também obtiveram êxito na detecção de *D. bryoniae* em tecidos sintomáticos de pepino e esporos coletados em estufa plástica, empregando-se a PCR Multiplex, com um oligonucleotídeo universal (UNLO28S22), associado em cada par dos oligonucleotídeos D7S e D6 desenhados a partir de informações de sequências depositadas no GenBank, específicas para *D. bryoniae*.

Assim este trabalho teve como objetivo detectar *D. bryoniae* em sementes de pepino partenocárpico por PCR Multiplex, empregando o conjunto de 'primers' D7S, D6 e UNLO28S22, previamente desenvolvidos para detecção desse fitopatógeno.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Extração de DNA

Para extração de DNA total de sementes utilizou-se um lote de sementes de pepino partenocárpico híbrido ‘‘Hokushin’’ (1L/022-11) adquirido em estabelecimento de comercialização de sementes em Maringá, PR. Para a extração de DNA total das sementes do híbrido ‘Hokushin’, seguiu-se o protocolo descrito por Koenig et al. (1997). As amostras de 50, 100 e 200 sementes do lote foram avaliadas sem embebição em água e embebidas por 24 e 48 horas. Após foram maceradas em nitrogênio líquido. Do macerado da amostra de 50 sementes foram retiradas quatro alíquotas de 300  $\mu$ L cada uma, do macerado das amostras de 100 e 200 sementes foram retiradas oito alíquotas de 300  $\mu$ L de cada macerado. Cada alíquota foi transferida para microtubos, onde foram adicionados 700  $\mu$ L de tampão de extração, que consiste na mistura dos tampões de lise nuclear (0,2 M Tris pH 7,5; 0,05 M EDTA e 2 % CTAB), tampão de isolamento de DNA (0,2 M Tris pH 7,5; 0,05 M EDTA e 0,35 M sorbitol) e sarkosil 5 %, nas proporções de 1:1:0,4, respectivamente. As amostras foram homogeneizadas em vórtex e incubadas a 65 °C por 60 minutos em banho-maria. Foi realizada a extração com solvente orgânico, adicionando-se 500  $\mu$ L da mistura clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção de 24:1, em cada microtubo. Após a centrifugação das amostras a 12.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para microtubos, adicionados de 5  $\mu$ L de uma suspensão contendo 20 mg/mL de RNase e incubados em banho-maria por 30 minutos a 37 °C. Em seguida, foram adicionados, em cada tubo, 5  $\mu$ L de uma suspensão contendo 20 mg/mL de proteinase K e incubados por 20 minutos a 37 °C. A precipitação do DNA foi feita com isopropanol na proporção 2/3 da solução aquosa em cada amostra. Após centrifugação, de 5 minutos a 10.000 rpm, o DNA foi lavado com etanol 70 % por três vezes. O etanol foi descartado e os tubos invertidos, abertos sob papel absorvente esterilizado por 10 a 15 minutos até o etanol evaporar. O DNA foi ressuscitado adicionando-se 100  $\mu$ L de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1 mM EDTA) e as amostras foram mantidas a 4 °C.

Quando necessário, foi efetuado o tratamento das amostras DNA com cloreto de lítio (LiCl) para melhorar sua qualidade. Este procedimento foi realizado adicionando-se 300  $\mu$ L de LiCl 4M, mantido em gelo, em cada amostra. Em seguida, o material foi incubado a 4 °C, por 30 minutos. Após a incubação, centrifugou-se as amostras a 12.000 rpm por 10 minutos.



O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo contendo 600 µL de isopropanol. As amostras foram agitadas gentilmente, mantidas em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente e, após, foram novamente centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante, o DNA foi lavado com 100 µL de etanol 70 % gelado, e centrifugou-se a 12000 rpm por 5 minutos. O etanol foi descartado e os tubos invertidos, abertos sob papel absorvente esterilizado por 10 a 15 minutos até o etanol evaporar. O DNA foi ressuspenso, adicionando-se 100 µL de tampão TE (10mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1 mM EDTA) e as amostras foram mantidas a 4 °C.

## 2.2. Reação de PCR Multiplex

O DNA total extraído de cada amostra de semente foi utilizado em reações de PCR Multiplex, utilizando-se o DNA original ou diluído em água em proporções variáveis. Como controle negativo foi utilizado o mix de reação de PCR sem adição de amostra de DNA. Como controle positivo foi utilizado amostra de DNA extraído de isolados de *D. bryoniae*, obtidos a partir de plantas de pepino partenocárpico com sintomatologia de podridão gomosa. Para as reações foram empregados os oligonucleotídeos ‘primers’ específicos D7S (5'-CTACAATTGCGGGCTTTGC), D6 (5' CGCCGATTGGACAAAACCTTAAA) e UNLO28S22 (5' GTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATG), em reação múltipla (KOCH; UTKHEDE, 2004). Estes oligonucleotídeos amplificam fragmentos genômicos de 535 pb (UNLO28S22 + D7S) e 461 pb (UNLO28S22 + D6) na presença de DNA de *D. bryoniae*. As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador Mastercycler Gradient, em microtubos contendo 25 µL da mistura de reação constituída por 50 mM de KCl; 10 mM de Tris; pH 7,5; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,5 unidades de Taq DNA polimerase; 0,2 mM de cada dNTP; 15 pmol de cada oligonucleotídeos e 40 ng de DNA de cada amostra. A reação de PCR foi baseada em 31 ciclos, sendo: 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 63 °C, e 45 segundos a 72 °C. Previamente aos ciclos, as amostras foram submetidas à temperatura de 94 °C por 3 minutos e de um período extra de extensão de 10 minutos a 72 °C, após os 31 ciclos.

Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 2 %, contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) e submerso em tampão TBE. A separação eletroforética ocorreu por aproximadamente 40 minutos, a 80 volts. Ao término da corrida, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as alíquotas de macerado das três amostras de sementes (50, 100 e 200 sementes) houve a amplificação de dois fragmentos de DNA com aproximadamente 535 pb e 461 pb em todas as amostras de sementes não embebidas em água. Para as sementes embebidas em água, ocorreram resultados positivos da PCR Multiplex apenas para algumas amostras. Para os dois tempos de embebição (24 e 48 h) houve uma relação direta entre a proporção de PCR positivos e o número de sementes analisadas (Tabela 1). Possivelmente por que, quanto maior o número de sementes, maior a chance de encontrar *D. bryoniae* associado às sementes. Já entre os tempos de embebição, houve uma relação inversa, ou seja, quanto maior o tempo de embebição, menor foi o número de respostas positivas da PCR, sendo negativo para todas as alíquotas de 50 sementes maceradas. Assim, os resultados indicam que o processo de embebição das sementes diminuiu a qualidade do DNA total extraído. Isso pode ter ocorrido porque as sementes embebidas entraram em processo de germinação, ocorrendo a liberação de substâncias inibidoras às reações enzimáticas, como polissacarídeos e compostos fenólicos.

A embebição das sementes, principalmente durante a primeira fase (em média, as duas horas iniciais), é acompanhada pela liberação de açúcares, aminoácidos e eletrólitos em quantidades variáveis. Entre esses exsudados, liberados pelas sementes, podem estar presentes muitas substâncias com potencial de inibição de reações de PCR (VAN DER ZOUWEN et al., 2002).

Há vários compostos, orgânicos e inorgânicos, que podem interferir negativamente na amplificação de ácidos nucleicos pela reação de PCR, em diferentes níveis, podendo chegar a inibi-la completamente (MOREIRA, 1998). Os inibidores interferem em um ou mais dos três pontos essenciais da reação, sendo eles: a ruptura da célula, essencial para a extração do DNA; a captação ou degradação do DNA alvo e inibição da atividade da enzima de polimerização (DNA Polimerase) (WILSON, 1997; AL-SOUD; RÅDSTROM, 1998). Entre os inibidores encontram-se componentes de alimentos (ex.: compostos orgânicos e fenólicos, glicogênico, gorduras e  $Ca^{2+}$ ), compostos do ambiente (ex.: compostos fenólicos, ácidos húmicos e metais pesados), constituintes de células bacterianas, DNA não-alvo, contaminantes e itens laboratoriais (ex.: pólen, talco da luva, recipientes plásticos e celulose).

**Tabela 1.** Amostras positivas para o patógeno *Didymella bryoniae* em sementes de pepino partenocárpico híbrido ‘Hokushin’ por PCR Multiplex em relação a amostras avaliadas

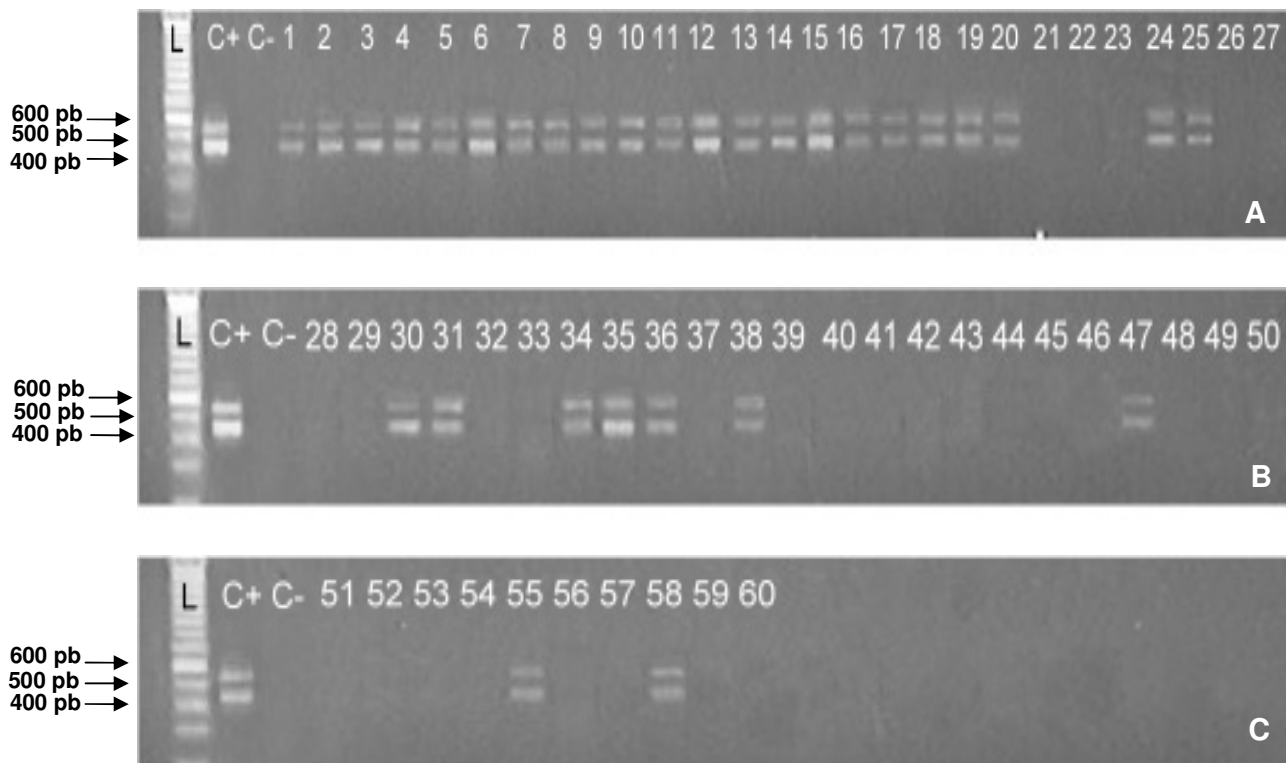
*Quantidade de sementes maceradas	Tempo de embebição em água		
	0	24 h	48 h
	Sub-amostras positivas/avaliadas	Sub-amostras positivas/avaliadas	Sub-amostras positivas/avaliadas
50	4/4	1/4	0/4
100	8/8	3/8	1/8
200	8/8	4/8	2/8

\*Para as amostras de 50,100 e 200 sementes foram analisadas quatro, oito e oito sub-amostras de DNA, respectivamente.

Para a embebição por 24 horas, utilizando-se 50 sementes maceradas, o número de amostras positivas foi de 25 %, e para 100 sementes maceradas, o número de amostras positivas foi de 37,5 % e para 200 sementes, 50% das amostras foram positivas para presença de *D. bryoniae* (Tabela 1).

Na embebição por 48 horas, utilizando-se 50 sementes, nenhuma reação positiva foi evidenciada para presença do patógeno. Resultado semelhante foi obtido por Gasparotto (2010) em sementes de meloeiro nobre híbrido ‘Sunrise’.

Nas quantidades de 100 e 200 sementes embebidas por 48 horas, amostras positivas de 12,5 % e 25 %, respectivamente, foram evidenciadas para presença do patógeno (Figura 1). Estes resultados diferem dos obtidos por Gasparotto (2010), utilizando os protocolos com CTAB, kit Plant DNAzol® Reagent e SDS, que mesmo após o tratamento das amostras com cloreto de lítio e realizando diferentes diluições a partir do DNA tratado, não evidenciou nenhuma resposta positiva para *D. bryoniae* associado às sementes de meloeiro nobre.



**Figura 1.** Gel de eletroforese apresentando especificidade na reação múltipla para *Didymella bryoniae* em amostras de DNA total de sementes. L- 1-100 pb ladder; C<sup>+</sup> - controle positivo; C<sup>-</sup> - controle negativo; Híbrido ‘Hokushin’: A) 1 a 4 - Amostras na quantidade de 50 sem embebição em água; 5 a12 - 100 sementes sem embebição em água; 13 a 20 - 200 sementes sem embebição; 21 a 24 - 50 sementes embebidas por 24 horas; 25 a 27 – 100 sementes embebidas por 24 h; B) 28 a 32 - 100 sementes embebidas por 24 h; 33 a 40 - 200 sementes embebidas por 24 h; 41 a 44 - 50 sementes embebidas por 48 h; 45 a 50 – 100 sementes embebidas por 48 h; C) 51 a 52 - 100 sementes embebidas por 48 h e 53 a 60 - 200 sementes embebidas por 48 h.

Pryor e Gilbertson (2001), utilizando o método de incubação de sementes e PCR relataram que, a incubação prévia das sementes de cenoura por cinco dias, foi necessária para detecção do patógeno *Alternaria radicina*. Neste sistema esses autores conseguiram detectar uma semente de cenoura infectada com *A. radicina* em lotes de até 1000 sementes (0,1 %). Estes autores relataram que, a incubação prévia das sementes de cenoura sob condições de alta umidade favoreceu o aumento da biomassa fúngica.

Vechiato et al. (2006) utilizando-se o método de incubação do papel de filtro modificado com 2,4 D associado à técnica de PCR, obtiveram respostas positivas para

detecção de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*, em sementes de soja, na proporção de uma semente infectada com o patógeno em 400 sementes (0,25 % de incidência).

Patógenos associados às sementes podem resultar em sua introdução em áreas não infestadas, como também pode ocorrer a introdução de raças mais agressivas em áreas já infestadas e ainda assegurar a presença do patógeno em estádios iniciais do desenvolvimento da cultura. Por isso, detectar e identificar patógenos em sementes é essencial (PINTO, 2005).

Existem diferentes métodos para detecção de *D. bryoniae* na semente, com variações na sensibilidade, reprodutibilidade, economicidade e rapidez de resultados (GASPAROTTO et al., 2009; NEERGAARD, 1979; LEE et al., 1984; MENTEN, 1985), sendo que alguns exigem incubação das semente, o que pode demorar de 7 a 30 dias e apresentar resultados subjetivos (MCGEE, 2002). No entanto, é de extrema importância a sua rápida e correta detecção. Com isso, novas técnicas moleculares, principalmente baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), surgem e tem sido utilizada como alternativas promissoras para o desenvolvimento de um teste rápido, prático e preciso de detecção de fungos em sementes (JACCOUD-FILHO et al., 1996; BLAKEMORE; REEVES, 2002; JACCOUD-FILHO et al., 2002a, b; JACCOUD-FILHO; DABUL, 2011).

A reação de polimerase em cadeia (PCR) é considerada a mais adequada para a diagnose de fungos por sua especificidade, visto que a confiabilidade e precisão dos métodos imunológicos e enzimáticos na diagnose podem ser afetados por amostras que contenham altos níveis de proteínas. Além disso, a técnica de PCR não é passível de variações em função do estádio de desenvolvimento do organismo, do tipo de tecido utilizado e das condições ambientais (NEALE et al., 1992).

Vários autores relatam a utilização da reação de PCR para detectar patógenos em sementes (PRYOR; GILBERTSON, 2001; SMITH et al., 1996; ZHANG et al., 1997; BALL; REEVES, 1991; BLAKEMORE; REEVES, 2002; JACCOUD-FILHO; REEVES, 1993; AUDY et al., 1996; JACCOUD-FILHO et al., 1997; CRUZ et al., 1996; SOUZA SANTOS et al., 1996; KONSTANTIOVA et al., 2002; VECHIATO et al., 2006, LANDA et al., 2007, CHILVERS et al., 2007, PELLEGRINO et al., 2010). U

Há estudos, que utilizaram PCR com o extrato das sementes embebidas, e relataram problemas com inibição da reação da PCR, devido a substâncias liberadas pelas sementes (JACCOUD-FILHO et al., 1996; JACCOUD-FILHO et al., 2002a,b).

Neste trabalho evidenciou-se que a PCR Multiplex demonstrou ser uma nova opção, rápida e sensível para a detecção de *D. bryoniae* associado às sementes de pepino

partenocárpico. A detecção do patógeno na semente é de fundamental importância para se evitar a utilização de sementes infectadas, evitando-se a disseminação do patógeno para áreas indenidas.

#### 4. CONCLUSÃO

A técnica de PCR Multiplex, utilizando-se os primers específicos foi eficiente para identificar *D. bryoniae* em sementes de pepino partenocárpico.

A embebição das sementes em água diminuiu o número de respostas positivas na detecção de *D. bryoniae* em amostras de DNA total de sementes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-SOUD, W. A.; RÅDSTROM, P. Capacity of Nine Thermostable DNA Polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-Inhibiting samples. **Applied and Environmental Microbiology**. v.64, n.10, p.3748-3753, 1998.
- AUDY, P.; BRAAT, C. E.; SAINDON, G.; HUANG, H.C.; LAROCHE, A. A rapid and sensitive PCR-based for current detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. **Phytopathology**, v.86, n.4, p.361-366, 1996.
- BALL, S. F. L.; REEVES, J. C. Application of rapid techniques to seed health testing prospects and potencial. In DUNCAN, J.M., TORRANCE, L. (Ed.). **Techniques for the rapid detection of plant pathogens**. Oxford: Blackwell Scientific Publ., p.193-207,1991.
- BLAKEMORE, E. J. A.; REEVES, J. C. Perspectives of the Use of Modern Techniques in Seed Health. In: MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J.; JACCOUD-FILHO, D. S. **Seed-Borne Fungi: A Contribution Routine Seed Health Analysis**. Switzerland: International Seed Testing Association. Section I, p.19-22, 2002.
- BROWN, M. E., HOWARD, E.M. ; KNIGHT, B. C. Seed-borne *Mycosphaerella melonis* on cucumber. **Plant Pathology**. v.19: 198p., 1970.
- CHILVERS, M. I.; DU TOIT, L. J.; AKAMATSU, H.; PEEVER, T. L. A real-time, quantitative PCR seed assay for *Botrytis* spp. that cause neck rot of onion. **Plant Disease**. v.91, p.599-608, 2007.
- CRUZ, L.; MANCEAU, C.; SOUSA-SANTOS, M.; OLIVEIRA, H. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. Tomato in tomato seeds using polymerase chain reaction. In: **2 nd Ista - PDC Symposium seed health testing towards the 21 St century**. CAB International, 84 p., 1996.
- GASPAROTTO, F.; VIDA, J. B.; TESSMANN, D. J.; BONALDO, S. M.; AGUIAR, R. L.; PENHARBEL, M. P. Eficiência de métodos para de *Didymella bryoniae* associado a sementes de híbridos de meloeiros nobres. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.31, n.3, p.397-402, 2009.
- GASPAROTTO, F. **Transmissão e controle de *Didymella bryoniae* em meloeiro nobre**. Tese (Doutorado). Maringá: UEM, 2010. 169p.
- GASPAROTTO, F.; VIDA, J. B.; TESSMANN, D. J.; ALVES, T. C. A. A. Latent infection by *Didymella bryoniae* in muskmelon. **Summa Phytopathologica**. v.37, n.1. p. 62-64, 2011.
- GUSMÃO, M. T. A.; GUSMÃO, S. A. L. Desenvolvimento de cultivares de pepino sob ambiente protegido, nas condições da Amazônia Oriental. **Anais. Congresso Brasileiro de Olericultura**. 2005.
- HA, Y.; FESSEHAIE, A.; LING, K. S.; WECHTER, W.P.; KEINATH, A. P.; WALCOTT, R. R. Simultaneous detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and *Didymella bryoniae* in



cucurbit seed lots using magnetic capture Hybridization and real-time polymerase chain reaction. **Phytopathology**, v.99, n.6, p.666-678, 2009.

JACCOUD FILHO, D. S.; DABUL, A. N. G. Novos métodos de detecção de fungos em sementes florestais. In: SANTOS, A. F.; PARISI, J. J. D.; MENTEN, J. O. M. **Patologia de sementes florestais**. Colombo: Embrapa, Cap. 6. p.69-86, 2011.

JACCOUD FILHO, D. S.; LEE, D.; BLAKEMORE, E. J. A.; REEVES, J. C. Demonstration of the use of molecular techniques for detection of *Phomopsis* species in soya bean seeds. In: MACHADO, J. C.; LANG RAK, C. J.; JACCOUD-FILHO, D. S. **Seed-Borne Fungi: A Contribution to Routine Seed Health Analysis. 1. ed. Switzerland: International Seed Testing Association**, Section II. p.92-110, 2002b.

JACCOUD FILHO, D. S.; LEE, D.; REEVES, J. C.; YORINORI, J. T. A PCR-based test for detection of *Phomopsis phaseoli* f. sp. *meridionalis* from soya bean seeds. In: **2nd Ista – PDC Symposium seed health testing towards the 21 St century**. CAB International, Session three. p.35, 1996.

JACCOUD FILHO, D. S.; MATIELLO, R. R.; TAYLOR, E.; BATES, J.; LEE, D.; MORAIS, M. H. Diagnose Molecular de Fungos em Sementes. P. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.10, p.287-331, 2002a.

JACCOUD-FILHO, D. S.; LEE, D.; REEVES, J. C.; YORINORI, J. T. Characterization of the Seed-borne Fungal Pathogen *Phomopsis phaseoli* f. sp. *Meridionalis*: the Agent of Soybean Stem Canker. In: **Hutchins, J. D.; Reeves, J. C. Seed health testing progress towards the 21 St century**. Cambridge: Cab International, Chapter 19.p.147-152, 1997.

JACCOUD-FILHO, D. S.; REEVES, J. C. Detection and identification of *Phomopsis* species in soya bean seeds using PCR. In: **1st. ISTA – PLANT DISEASE COMMITTEE: SYMPOSIUM ON SEED HEALTH TESTING**. Canada: ISTA, p.34-43, 1993.

KEINATH, A. P. Soil amendment with cabbage residue and crop rotation to reduce gummy stem blight and increase growth and yield of watermelon. **Plant Disease**. v.80: p.564-570, 1996.

KEINATH, A. P.; FARNHAM, M. W.; ZITTER, T. A. Morphological, pathological, and genetic differentiation of *Didymella bryoniae* and *Phoma* spp. Isolated from cucurbits. **Phytopathology**, v.85, p.64-369, 1995.

KOCH, C. A.; UTKHEDE, R. S. Development of a Multiplex classical Polymerase chain reaction technique for detection of *Didymella bryoniae* in infected cucumber tissues and greenhouse air samples. **Canadian Journal Plant Pathology**, v.26, p.291-298, 2004.

KOCH, C. A.; UTKHEDE, R. S. Diagnosis and identification of *Didymella bryoniae*, causal agent of gummy stem blight of greenhouse cucumbers, using a dot blot technique. **Journal Horticultural Science Biotechnology**, v.77, p.62-66, 2002.

KOENIG, R. L.; PLOETZ, R. C.; KISTLER, H. C. *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense consists of a small number of divergent and globally distributed clonal lineages. **Phytopathology**, St. Paul, v.87, n.9, p.915-923, 1997.

- KOIKE, S. T. First report of gummy stem blight, caused by *Didymella bryoniae*, on watermelon transplants in California. **Plant Disease**, v.81, p.1331, 1997.
- KONSTANTIOVA, P.; BATES, J. A.; TAYLOR, E. J. A. The application of real-time PCR to the identification and detection of *Ustilago nuda* in barley seeds. In: **4 th ISTA – PDC SEED HEALTH SYMOSIUM: HEALTHY SEEDS, THE BASIS FOR SUSTAINABLE FARMING**. The Netherlands: ISTA, Cap. 15. p.24, 2002.
- LANDA, B. B.; MONTES-BORREGO, M.; MUÑOZ-LEDESMA, F. J.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. Phylogenetic analysis of downy mildew pathogens of opium poppy and PCR- based in plant and seed detection of *Peronospora arborescens*. **Phytopathology**, v.97, p.1380-1390, 2007.
- LEE, H.; MATHUR, S. B.; NEERGAARD, P. Detection and location of seed-borne inoculum of *Didymella bryoniae* and its transmission in seedlings of cucumber and pumpkin. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.109, p.301-308, 1984.
- McGEE, D. C. Principles, advantages and limitations of seed health testing methods. In: MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J.; JACCOUD-FILHO, D. S. **Seed-borne Fungi: A Contribution to routine seed health analysis**. 1. ed. Switzerland: International seed testing association, Section I. p.2-8, 2002.
- MENTEN, J. O. M. Diagnóstico da Patologia de Sementes de Girassol no Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, v.7, n.1, p.25-30, 1985.
- MOREIRA, D. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. **Nucleic Acids Research**. v.26, n.13, p.3309-3310, 1998.
- NEALE, D.B.; DEVEY, M.E.; JERMSTAD, K. D. Use of DNA markers in forest tree improvement research. **New Forests**, London, n. 5. p.1-17, 1992.
- NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: Macmillan, 839p., 1979.
- PELLEGRINO, C.; GILARDI, G.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. Detection of *Phoma valerianellae* in lamb's lettuce seeds. **Phytoparasitica**, v.38, p.159–165, 2010.
- PINTO, N. F. J. A. Análise Sanitária na produção de sementes de grandes culturas. In: ZAMBOLIM, L. **Sementes: Qualidade Fitossanitária**. Viçosa: DFP, 2005. Cap. 11. p.295-332.
- PRYOR, B.M ; GILBERTSON, R.L. A PCR based assay for detection of *Alternaria radicina* on carrots seed. **Plant Disease**, St. Paul, v.85, p.18-23, 2001.
- RIZZO, A.A.N.; FERREIRA, M.R.; BRAZ, L.T. Ação de acibenzolar-s-methyl (BTH) isolado e em combinação com fungicidas no controle do cancro da haste em melão rendilhado. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.21, n.2, p.238-240, 2003.
- SMITH, O.P.; PETERSON, G.L.; BECK, R.J.; SCHAAD, NW.; BONDE, M.R. Development of a PCR-basead method for identificação of *Tilletia indica*, causal agent of carnal bunt of wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v.86, p.115-22, 1996.

SOMAI, B. M.; KEINATH, A.P.; DEAN, R. A. Development of PCR-ELISA for detection and differentiation of *Didymella bryoniae* from related *Phoma* species. **Plant Disease**, v.86, p.710-716, 2002.

SOUZA SANTOS, M.; CRUZ, L.; HENRIQUE, L.; DUARTE, T. A rapid and sensitive detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* in tomato seed by polymerase chain reaction analysis. In: **2nd ISTA – PDC SYMPOSIUM: SEED HEALTH TESTING TOWARDS THE 21ST CENTURY**. CAB International, 1996. 84p.

SUDISHA, J.; NIRANJANA, S. R.; UMESHA, S.; PRAKASH, H. S.; SHEKAR SHETTY, H. Transmission of seed-borne infection of muskmelon by *Didymella bryoniae* and effect of seed treatments on disease incidence and fruit yield. **Biological Control**, v.37, n.1, p.196-205, 2006.

VAN DER ZOUWEN, P. S.; BONANTS, P. J. M.; VAN DEN BULK, R. W.; KONSTANTINOVA, P.; VAN GENT-PELZER, M. P. E. Development of a PCR-assay for *Alternaria* spp. In carrot. In: **4TH ISTA – PDC SEED HEALTH SYMPOSIUM: HEALTHY SEEDS, THE BASIS FOR SUSTAINABLE FARMING**. The Netherlands: ISTA, 2002, 61p. Cap. 44. p.53.

VECHIATO, M. H.; MARINGONI, A. C.; MARTINS, E. M. F. Development of primers and method for identification and detection of *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* in soybean seeds. **Summa Phytopathologica**, v.32, n.2, p.161-169, 2006.

VERSIGNASSI, J. R.; VIDA, J. B.; LORENZETTI, E. R.; FARIA, G. S.; GASPAROTTO, F.; CORTEZ, G. L.; GOMES, R. C. ; CILIATO, F. L. Transmissão de *Didymella bryoniae* por sementes de pepino “partenocárpico”. **Summa Phytopathologica**, v.30, p.93, 2004.

VIDA, J. B.; TESSMANN, D. J.; ZAMBOLIM, L.; VERZIGNASSI, J. R.; BRANDÃO FILHO, J. U. T. Controle da podridão gomosa em melão rendilhado por sanitização de ferramenta de poda. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.6, p.626-631, 2004.

WALCOTT, R.R. **Integrated pest management of bacterial fruit blotch of cucurbits. in Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria**. (Eds. A. Ciancio and K.G. Mukerji), Springer, Netherlands. p.191-209. 2008.

WILSON, I. G. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. **Applied and Environmental Microbiology**. v.63, n.10, p.3741-3751, 1997.

ZHANG, A. W. ; HARTMAN, G.L.; RICCIONI, L.; CHEN, W. D.; MA, R.Z.; PEDERSEN, W. L. Using PCR to distinguish *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from other soybean fungal pathogens and to detect them in soybean tissues. **Plant Disease**, St. Paul v.81, p.1143-1149, 1997.

### **CAPÍTULO III**

## **INFECÇÃO LATENTE DE *Didymella bryoniae* EM PLANTA DE PEPINO PARTENOCÁRPICO**

## RESUMO

A podridão gomosa, causada por *Didymella bryoniae*, apresenta-se como fator limitante à produtividade de cucurbitáceas, principalmente de híbridos de pepino. Há fortes suspeitas da ocorrência de infecção latente de *D. bryoniae* em plântulas assintomáticas de pepino partenocárpico, no entanto, sem comprovação. Assim, a capacidade de detectar rapidamente o patógeno em mudas é importante para minimizar o impacto de *D. bryoniae* em mudas transplantadas para o campo e conseqüentemente minimizar os impactos negativos na produção. No presente trabalho objetivou-se constatar a ocorrência de infecção latente de *D. bryoniae* em mudas assintomáticas de pepino partenocárpico, híbrido 'Hokushin', utilizando a técnica de PCR Multiplex. Para isso realizou-se a investigação de infecção latente com extração de DNA total da região do coleto de mudas assintomáticas originadas de sementes não tratadas; originadas de sementes tratadas com o fungicida piraclostrobina e de sementes tratadas com piraclostrobina + tiofanato metílico+fipronil. Constataram-se infecções latentes em mudas não tratadas e tratadas com os dois fungicidas.

**Palavras-chaves:** Podridão gomosa. *Cucumis sativus*. Infecção latente.

## ABSTRACT

The gummy rot, caused by *Didymella bryoniae*, presents itself as a limiting factor to productivity of cucurbits, especially cucumber hybrids. There are strong suspicions the occurrence of latent infection of *D. bryoniae* in asymptomatic Japanese cucumber seedlings, however, unproven. Thus, the ability to quickly detect a pathogen in plants is important to minimize the impact of *D. bryoniae* in seedlings transplanted to the field and consequently minimize negative impacts on production. This study aimed to verify the occurrence of latent infection of *D. bryoniae* in parthenocarpic cucumber seedlings asymptomatic, 'Hokushin' hybrid, using Multiplex PCR. For this there was the investigation of latent infection with total DNA extraction region of the girth of seedlings originating from asymptomatic untreated seeds; originated from seeds treated with the fungicide pyraclostrobin and seeds treated with pyraclostrobin + thiophanate methyl + fipronil. It was discovered latent infections in seedlings and treated not treated with the two fungicides.

**Keywords:** Gummy rot. *Cucumis sativus*. Latent infection.

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a podridão gomosa, causada por *Didymella bryoniae* (Auersw) Rehm, anamorfo *Ascochyta cucumis* Fautrey; Roum, tem aumentado de importância nos estados da região Nordeste, Sul e Sudeste, principais regiões produtoras de pepino no Brasil, chegando a ser apontada como um dos principais problemas fitossanitários de cucurbitáceas (RIZZO et al., 2003; TSUTSUMI; SILVA, 2004). Devido aos altos danos tanto em cultivos em campo aberto, convencionais, quanto em ambiente protegido, a podridão gomosa é considerada a mais destrutiva doença em pepineiros (UTKHEDE; KOCH, 2004). Um aspecto importante da doença é o fato do seu agente causal ser transmitido pela semente (LING et al., 2010). O inóculo originado da semente pode infectar caules, folhas e frutos de todas as cucurbitáceas, incluindo pepino, melancia, melão e abobrinha (CHIU; WALKER, 1949; PUNITHALINGAM; HOLLIDAY, 1972).

Em pepino, a infecção na flor pode levar a subseqüentes podridões internas ou infecções assintomáticas dos frutos. (CHIU; WALKER, 1949; VAN STEEKELENBURG, 1986). A manifestação de sintomas de podridão gomosa anterior ao transplante para o campo definitivo permite a eliminação das mudas doentes, evitando a introdução de inóculo na cultura (KEINATH, 1996). O autor ainda ressalta que, plantas assintomáticas ao lado de plantas doentes podem já ter sido infectadas.

A infecção latente por patógenos de plantas torna-se um dos maiores problemas pela dificuldade de diagnose precoce da doença pela ausência de sintomas, o que pode resultar na adoção tardia de medidas de controle, comprometendo a sua eficiência. Para *D. bryoniae*, a grande importância da possível infecção latente de inóculo originário de sementes são as implicações na epidemiologia da doença na cultura do pepino partenocárpico em ambiente protegido (VIDA et al., 2004).

A primeira referência da possibilidade de infecção latente de *D. bryoniae* foi relatada em cultivo de meloeiro nobre onde os primeiros sintomas se manifestaram cerca de 35 dias após o transplante para estufa (VIDA et al., 2002). Em outro trabalho, mudas de meloeiro nobre, infectadas por *D. bryoniae*, permaneceram assintomáticas e os sintomas da doença só se manifestaram após o transplante para o solo (GASPAROTTO, 2006).

Diante da necessidade de um diagnóstico rápido, sensível e eficiente para o patógeno *D. bryoniae*, foi desenvolvido com sucesso um protocolo de PCR Multiplex, utilizando dois conjuntos de oligonucleotídeos específicos para a detecção em tecidos de cucurbitáceas com

sintomas de podridão gomosa (KOCH; UTKHEDE, 2004). Assim, a capacidade de detectar rapidamente o patógeno em mudas é importante para minimizar o impacto de *D. bryoniae* em mudas transplantadas para o campo e conseqüentemente não afetar a produção. Por isso, o objetivo do presente trabalho foi constatar a partir de sementes tratadas ou não com fungicidas, a ocorrência de infecção latente de *D. bryoniae* em mudas de pepino partenocárpico híbrido 'Hokushin', empregando a técnica de PCR Multiplex, utilizando-se dois conjuntos de oligonucleotídeos específicos para detecção do patógeno.



## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em janeiro/2012, em casa-de-vegetação e as análises moleculares foram realizadas no laboratório de Biologia Molecular da Universidade Estadual de Maringá (UEM), no município de Maringá, Estado do Paraná. Para a condução do trabalho foram utilizados lotes de sementes de pepino partenocárpico híbrido 'Hokushin' (lote 1L/022-11) adquiridos em lojas comerciais de Maringá, PR.

### 2.1. Obtenção das plantas de pepino partenocárpico

Utilizou-se o substrato comercial a base de casca de *Pinus* sp. carbonizada, autoclavado duas vezes a 120 °C, a 1 atm, durante duas horas, com intervalo de autoclavagem de 24 horas. Após um período de descanso de 72 horas, o substrato foi distribuído em bandejas de poliestireno expandido de 128 células. Em seguida, realizou-se a semeadura de trezentas e sessenta sementes comerciais de pepino partenocárpico híbrido 'Hokushin'. Destas trezentas e sessenta sementes semeadas, em cento e vinte sementes não houve tratamento, outras cento e vinte sementes foram tratadas com o fungicida piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L de água e outras cento e vinte sementes foram tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes. Aos quatro dias após emergência metade das plântulas foram transferidas para o substrato solo:areia 1:1 v/v esterilizado. As plantas foram mantidas em condições de casa-de-vegetação semi-climatizada.

Realizou-se a detecção de infecção latente por PCR Multiplex do DNA extraído do hipocótilo de plântulas a partir de sementes tratadas e não. Realizaram-se oito coletas. A primeira coleta quatro dias após a emergência das plântulas, coletando-se oito plantas assintomáticas aleatoriamente, sendo quatro plantas do substrato a base de casca de *Pinus* sp. carbonizada e quatro do substrato solo:areia. A segunda coleta foi realizada oito dias após a emergência, coletando-se mais quatro plantas assintomáticas de cada substrato. A terceira coleta aos doze dias após emergência. As coletas foram realizadas a cada quatro dias até aos 32 dias após a emergência. As plântulas que apresentaram sintomas no decorrer das coletas foram descartadas. Esse procedimento foi adotado para evitar disseminação de inóculo de plantas doentes para plantas sadias. Cortou-se todo o segmento do hipocótilo em cada plântula na região do coleto e abaixo das folhas cotiledonares. Cada segmento foi, lavado com água

destilada e armazenado em freezer a -20 °C até o momento da extração de DNA. Para a extração do DNA total cada segmento da planta foi macerada individualmente constituindo uma amostra.

As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação por 32 dias após emergência e foram avaliadas diariamente quanto ao aparecimento de sintomas de podridão gomosa e ou sinais do patógeno.

### 3.1. Extração de DNA total

Para a extração do DNA total em todos os experimentos seguiu-se o protocolo descrito por Koenig et al. (1997). O tecido das amostras foi macerado em nitrogênio líquido até obter a consistência de um fino pó. Aproximadamente 300 µL do macerado foram transferidos para microtubos, onde foram adicionados 700 µL de tampão de extração, que consiste na mistura dos tampões de lise nuclear (0,2 M Tris pH 7,5; 0,05 M EDTA e 2 % CTAB), tampão de isolamento de DNA (0,2 M Tris pH 7,5; 0,05 M EDTA e 0,35 M sorbitol) e sarkosil 5 %, nas proporções de 1:1:0,4, respectivamente. Os tubos foram homogeneizados em vórtex e incubados a 65 °C por 60 minutos em banho-maria. Foi realizada a extração com solvente orgânico, adicionando-se 500 µL da mistura clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção de 24:1, em cada microtubo. Após a centrifugação das amostras a 12.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para microtubos, adicionados de 5 µL de uma suspensão contendo 20 mg/mL de RNase e incubados em banho-maria por 30 minutos a 37 °C. Em seguida, foi adicionado, em cada tubo, 5 µL de uma suspensão contendo 20 mg/mL de proteinase K e incubados por 20 minutos a 37 °C. A precipitação do DNA foi feita com isopropanol na proporção 2/3 da solução aquosa em cada amostra. Após centrifugação, de 5 minutos a 10.000 rpm, o DNA foi lavado com etanol 70 % por três vezes. O etanol foi descartado e os tubos invertidos, abertos sob papel absorvente esterilizado por 10 a 15 minutos até o etanol evaporar. O DNA foi ressuspenso adicionando-se 100 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1 mM EDTA) e as amostras foram mantidas a 4 °C.

As amostras de DNA foram tratadas com cloreto de lítio (LiCl) para melhorar sua qualidade. Este procedimento foi realizado adicionando-se 300 µL de LiCl 4M, mantido em gelo, em cada amostra. Em seguida, o material foi incubado a 4 °C, por 30 minutos. Após a incubação, centrifugou-se as amostras a 12000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo contendo 600 µL de isopropanol. As amostras foram

agitadas gentilmente, mantidas em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente e, após, foram novamente centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante, o DNA foi lavado com 100 µL de etanol 70 % gelado, e centrifugou-se a 12000 rpm por 5 minutos. O etanol foi descartado e os tubos invertidos, abertos sob papel absorvente esterilizado por 10 a 15 minutos até o etanol evaporar. O DNA foi ressuspendido, adicionando-se 100 µL de tampão TE (10mM Tris-HCl Ph 7,5; 0,1 mM EDTA) e as amostras foram mantidas a 4 °C.

#### 4.1. Reação de PCR Multiplex

O DNA total extraído de cada amostra de planta foi utilizado em reações múltiplas de PCR, utilizando-se o DNA original ou diluído em tampão TE em proporções variáveis. Como controle negativo foi utilizado o mix de reação de PCR sem adição de amostra de DNA. Como controle positivo foi utilizada amostra de DNA extraído de isolados de *Didymella bryoniae*, obtidos a partir de plantas de pepino com sintomatologia de podridão gomosa. Para as reações de PCR foram empregados os oligonucleotídeos específicos D7S (5'-CTACAATTGCGGGCTTTGC), D6 (5' CGCCGATTGGACAAAACCTTAAA) e UNLO28S22 (5' GTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATG), em reação múltipla (KOCH; UTKHEDE, 2004). Estes oligonucleotídeos amplificam fragmentos genômicos de 535 pb (UNLO28S22 + D7S) e 461 pb (UNLO28S22 + D6) na presença de DNA de *Didymella bryoniae*. As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador Tpersonal Whatman Biometra, em microtubos contendo 25 µL da mistura de reação constituída por 50 mM de KCl; 10 mM de Tris; pH 7,5; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,5 unidades de Taq DNA polimerase; 0,2 mM de cada dNTP; 15 pmol de cada oligonucleotídeos e 40 ng de DNA de cada amostra. A reação de PCR foi baseada em 31 ciclos, sendo: 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 63 °C, e 45 segundos a 72 °C. Previamente aos ciclos, as amostras foram submetidas à temperatura de 94 °C por 3 minutos e de um período extra de extensão de 10 minutos à 72 °C, após os 31 ciclos.

Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose a 2 %, contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) e submerso em tampão TBE. A separação eletroforética foi de aproximadamente 40 minutos, a 80 volts. Ao término da corrida, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Infecção latente em hipocótilo assintomático de plântulas de pepino partenocárpico originadas de sementes não-tratadas e tratadas com fungicida

Através da técnica de PCR Multiplex utilizando-se de oligonucleotídeos específicos, foi possível constatar a infecção latente do patógeno em amostras de DNA total extraído do caule de plantas assintomáticas de pepino partenocárpico, a partir de quatro dias após a emergência das plantas, havendo a amplificação de dois fragmentos genômicos de aproximadamente 535 pb (UNLO28S22 + D7S) e 461 pb (UNLO28S22 + D6) (KOCH; UTKHEDE, 2004).

No decorrer do experimento as plantas que apresentavam sintomatologia de podridão gomosa foram descartadas. Esse procedimento foi adotado para evitar disseminação de inóculo de plantas doentes para plantas sadias.

Para as plantas em que as sementes não foram tratadas e semeadas no substrato à base de casca de *Pinus* sp. carbonizada nenhum sinal ou sintoma de *D. bryoniae* foram observados visualmente até 32 dias após a emergência. Da mesma forma nenhum sinal ou sintoma do patógeno foi observado nas plantas em que as sementes foram tratadas com fungicidas piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L de água e com piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes.

Por outro lado, para as plantas que foram transplantadas para solo:areia foi possível observar visualmente os sintomas de podridão gomosa. Considerando o total de 60 plantas sem o tratamento das sementes e transplantadas para solo:areia, foi possível constatar visualmente sintomatologia de podridão gomosa em sete plantas até os 32 dias após a emergência. Isto representa uma porcentagem de transmissão semente-planta com *D. bryoniae* de 11,6 %.

Para as plantas em que as sementes foram tratadas com o fungicida piraclostrobina observou-se os primeiros sintomas de podridão gomosa aos 32 dias após a emergência em quatro das sessenta plantas transplantadas. Nas plantas em que as sementes foram tratadas com o fungicida piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil, sinal e sintoma do patógeno foram observados em uma das sessenta plantas de pepino partenocárpico mantidas até aos 32 dias após a emergência em casa-de-vegetação.

Não se evidenciou sintomatologia de *D. bryoniae* nas plantas que permaneceram em substrato a base de casca de *Pinus* sp. carbonizada, diferente das plantas de pepino partenocárpico com sinais e sintomas do patógeno que foram transplantadas para solo:areia, o que provavelmente foi ocasionado pelo stress no momento do transplante, podendo assim, ter contribuído para maior susceptibilidade do hospedeiro e manifestação do patógeno. Este fato comprova a maior incidência de *D. bryoniae* verificada também no teste de transmissão após o transplante das mudas de pepino partenocárpico híbrido 'Hokushin' para solo:areia.

Os primeiros sintomas observados ocorreram aos 22 dias após a emergência das plantas transplantadas em solo:areia, sem o tratamento de sementes, iniciando-se nas folhas cotiledonares, que apresentaram-se com pequenas lesões circulares de coloração marrom, rodeadas ou não por um halo clorótico. Em algumas plantas a infecção iniciou-se nas bordas crescendo em direção à nervura central. Já em outras plantas a infecção iniciava no centro da folha cotiledonar expandindo-se até as bordas (Figura 1). Observou-se nas lesões, a ocorrência de numerosos corpos de frutificação negros. Essas estruturas foram observadas ao microscópio óptico permitindo a constatação da presença de picnídios/conídios.



**Figura 1.** Sintoma de *D. bryoniae* no tecido cotiledonar.

Sintomas semelhantes foram observados por Verzignassi et al. (2004) em plântulas de pepino assintomáticas, com 21 dias de idade, observando a formação de picnídios de coloração negra (forma anamórfica, *Ascochyta* sp.) e de ascocarpos de coloração branca (forma teleomórfica, *D. bryoniae*) no caule, próximo à região de inserção das folhas cotiledonares.

Em plântulas de pepino partenocárpico sem tratamento das sementes e semeadas em substrato a base de casca de *Pinus* sp. carbonizada, foi possível constatar a infecção latente do patógeno *D. bryoniae*, em 12 amostras de DNA total das 32 plântulas assintomáticas coletadas, aos 32 dias após a emergência. Para as plântulas as quais as sementes foram tratadas com piraclostrobina respostas positivas para a presença de *D. bryoniae* foi constatada em 5 amostras de DNA total das 32 plantas coletadas (Tabela 1).

**Tabela 1.** Detecção por PCR Multiplex de infecção latente de *Didymella bryoniae* em caules de plântulas de pepino partenocárpico assintomáticas, do híbrido ‘Hokuskin’, a partir por sementes não-tratadas, tratadas com piraclostrobina e tratadas com piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil, semeadas em substrato a base de casca de *Pinus* sp. carbonizada (Plant Max HF<sup>®</sup>)

Dias após emergência (DAE)	Plantas com <i>D. bryoniae</i> em infecção latente/Número de plantas coletadas		
	Sem tratamento	Piraclostrobina	Piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil
	Plant Max HF <sup>®</sup>	Plant Max HF <sup>®</sup>	Plant Max HF <sup>®</sup>
4	1/4	1/4	1/4
8	2/4	1/4	1/4
12	2/4	0/4	0/4
16	2/4	2/4	0/4
20	1/4	1/4	0/4
24	2/4	0/4	0/4
28	1/4	0/4	0/4
32	1/4	0/4	0/4
<b>Total</b>	12/32	5/32	2/32

\*Valores referentes a amostra de 60 plantas em cada tratamento.

Quando as sementes foram tratadas com fungicida piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil detectou-se a presença do patógeno *D. bryoniae*, em duas amostras de DNA total do caule de pepino partenocárpico das 32 plantas coletadas. Não foi possível detectar o patógeno associado a nenhuma das amostras de DNA do caule coletadas a partir dos 12 e 24 dias após a emergência para plântulas com sementes tratadas, com fungicida piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil e piraclostrobina, respectivamente (Tabela 1).

Em solo:areia das 32 amostras sem tratamento das sementes, houve 11 respostas positivas para detecção de *D. bryoniae* representando 34,4 % de associação entre o patógeno *D. bryoniae* e as plântulas de pepineiro. Para as plântulas as quais as sementes foram tratadas com piraclostrobina detectou-se a presença do patógeno em 5 amostras, representando 15,6 % de associação entre o *D. bryoniae* e as plântulas de pepino (Tabela 2).

**Tabela 2.** Detecção por PCR Multiplex de infecção latente de *Didymella bryoniae* em caules de plântulas de pepino partenocárpico assintomáticas, do híbrido 'Hokuskin', a partir por sementes não-tratadas, tratadas com piraclostrobina e tratadas com piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil, semeadas em solo:areia

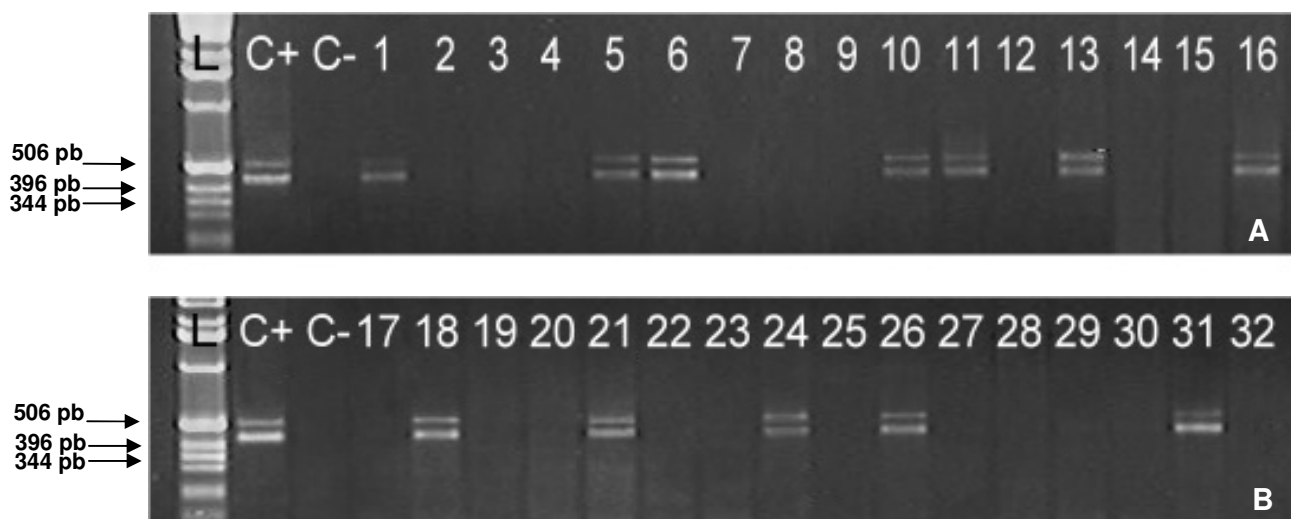
Dias após emergência (DAE)	Plantas com <i>D. bryoniae</i> em infecção latente/Número de plantas coletadas		
	Sem tratamento	Piraclostrobina	Piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil
	Solo:areia	Solo:areia	Solo:areia
4	1/4	0/4	0/4
8	1/4	1/4	1/4
12	1/4	2/4	1/4
16	1/4	1/4	1/4
20	1/4	1/4	0/4
24	2/4	0/4	0/4
28	2/4	0/4	0/4
32	2/4	0/4	0/4
<b>Total</b>	11/32	5/32	3/32

\*Valores referentes a amostra de 60 plantas em cada tratamento.

Porcentagens inferiores de associação do patógeno *D. bryoniae* com as plântulas de pepino partenocárpico foi evidenciado para as sementes tratadas com piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil, representando uma associação de 9,3 %. Os resultados mostraram que, o tratamento de sementes influenciou positivamente, reduzindo o número de amostras positivas para a detecção de *D. bryoniae*. Quando as sementes foram tratadas com piraclostrobina e piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil, houve uma redução de respostas positivas para a presença do patógeno de 54,6 e 72,8 %, respectivamente.

Isto mostra a eficiência do tratamento de sementes na redução ou erradicação do patógeno. Trabalhos desenvolvidos por Picinini e Fernandes (1999), demonstraram que, os fungicidas difenoconazole, difenoconazole + iprodiona e triadimenol + iprodiona foram eficientes em reduzir ou erradicar o fungo *Bipolaris sorokiniana* de sementes de cevada com 96 a 100 % de controle.

De acordo com a Figura 2, os resultados mostram que houve a amplificação dos fragmentos genômicos de 535 pb e 461 pb, específicos para *D. bryoniae*, a partir do caule de plantas que estavam assintomáticas até os 32 dias após emergência em condição de casa-de-vegetação. Este fato corrobora a hipótese de que o patógeno apresenta infecção latente em plantas de pepino partenocárpico.



**Figura 2.** Gel de eletroforese apresentando especificidade na reação múltipla para *D. bryoniae*. L – 1 Kb pb ladder; C<sup>+</sup> – Isolado de *D. bryoniae* (controle positivo); C<sup>-</sup> – controle negativo; Plantas assintomáticas de pepino ‘Hokushin’ cultivadas em substrato a base de casca de *Pinus* sp. carbonizada: A) 1 a 4 – Amostras coletada aos 4 dias após emergência (DAE); 5 a 8 – Amostras coletadas 8 DAE; 9 a 12 – Amostras coletadas aos 12 DAE; 13 a 16 – Amostra coleta aos 16 DAE B) 17 a 20 – Amostras coletadas aos 20 DAE; 21 a 24 – Amostras coletadas aos 24 DAE; 25 a 28 – Amostras coletadas aos 28 DAE, 29 a 32 – Amostras coletadas aos aos 32 DAE.

Infecção latente de *D. bryoniae* foi constatada também em plântulas de meloeiro nobre assintomáticas do híbrido Bonus II, com associação entre o patógeno e as plântulas de



48 % (GASPAROTTO, 2010). Neste trabalho, porcentagens inferiores de associação entre o patógeno e as plântulas de pepineiro foram encontradas variando de 15,6 a 37,5 %.

Huvenne et al. (2011) estudaram sobre o acúmulo do fungo *Fusarium foetens* nas plantas de *Begonia x hiemalis* antes e durante a sua expressão dos sintomas e evidenciaram a partir da PCR em tempo real, infecção latente do patógeno em raízes de plantas assintomáticas de *Begonia x hiemalis*.

O grande problema da ocorrência de infecção latente de *D. bryoniae* é que plantas infectadas podem não manifestar sintomas na fase de produção de mudas, dificultando o seu descarte antes do transplante para a estufa (GASPAROTTO, 2010). Segundo Gasparotto (2006), mudas com infecção latente transplantadas, dentro de 15 dias pós-transplante, manifestam sintomatologia de podridão gomosa. Ainda segundo a autora, analisando sementes de meloeiros nobres cultivados no Brasil, dependendo do híbrido, a porcentagem de transmissão, com possível ocorrência de infecção latente, pode chegar a 59 %. Para plantas de meloeiro nobre observou-se que, o período mínimo de latência foi 28 dias entre a semeadura e o aparecimento de sintomas em plântulas do híbrido Sunrise (GASPAROTTO, 2006).

A latência pode ser definida quando o hospedeiro é colonizado por um patógeno e que não apresenta quaisquer sintomas (AGRIOS, 2005; SHURTLEFF; AVERRE, 1997) ou em que a esporulação do microrganismo não tenha começado (VANDERPLANK, 1975). Isto corresponde ao estado das plântulas de pepino partenocárpico desde o primeiro dia após emergência.

Whidam e King (1983) apontam para a importância da infecção latente e não sintomática de *Fusarium moniliforme*, informando que a presença do fungo em tecidos assintomáticos de raízes é muito mais comum do que se pode constatar pela literatura disponível sobre o assunto. Os autores esclarecem que a plântula com infecção latente, portanto sem comprometimento da germinação ou emergência, necessita de condições de estresse para que o fungo se torne patogênico; em plantas já adultas, o fator estressante, responsável pelo desencadeamento dos sintomas, geralmente é atribuído ao enfraquecimento dos tecidos por ocasião da senescência.

Pelos resultados encontrados neste trabalho, constando-se a ocorrência de infecção latente de *D. bryoniae* em pepino partenocárpico com inóculo a partir de sementes, pode-se observar a importância que se deve ter com a qualidade sanitária das sementes utilizadas, evitando-se a utilização de sementes infectadas, e a disseminação do patógeno para áreas indenes.

#### **4. CONCLUSÃO**

A partir da PCR Multiplex com oligonucleotídeos específicos foi possível detectar a infecção latente de *D. bryoniae* em plântulas de pepino partenocárpico.

## REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. Burlington, MA: Elsevier Academic, 2005. 922p.
- CHIU, W. F.; WALKER, J. C. Morphology and variability of the cucurbit back rot fungus. **Journal of Agricultural Research**, v. 78, p. 81-102, 1949.
- GASPAROTTO, F. **Avaliação da sanidade sementes de híbridos de meloeiro nobre indicados para cultivo protegido**. Maringá, 2006. 42p. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Maringá.
- GASPAROTTO, F. **Transmissão e controle de *Didymella bryoniae* em meloeiro nobre**. Maringá, 2010. 169p. Tese (doutorado). Universidade Estadual de Maringá.
- HUVENNE, H.; DEBODE, J.; MAES, M.; HEUNGENS, K. R. Real-time PCR mediated monitoring of *Fusarium foetens* in symptomatic and non-symptomatic hosts. **European Journal of Plant Pathology**, v. 131, n. 4, p. 705-717, 2011.
- KEINATH, A. P. Soil amendment with cabbage residue and crop rotation to reduce gummy stem blight and increase growth and yield of watermelon. **Plant Disease**. 80:p. 564-570, 1996.
- KOCH, C. A.; UTKHEDE, R. S. Development of a Multiplex classical Polymerase chain reaction technique for detection of *Didymella bryoniae* in infected cucumber tissues and greenhouse air samples. **Canadian Journal Plant Pathology**, v. 26, p. 291-298, 2004.
- KOENIG, R. L.; PLOETZ, R. C.; KISTLER, H. C. *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* consists of a small number of divergent and globally distributed clonal lineages. **Phytopathology**, St. Paul, v.87, n.9, p.915-923,1997.
- LING, K. S.; WECHTER, W. P.; SOMAI, B. M.; WALCOTT, R. R.; KEINATH, A. P. An improved real-time PCR system for broad-spectrum detection of *Didymella bryoniae*, the causal agent of gummy stem blight of cucurbits. **Seed Science and Technology**, v. 38, p. 692-703, 2010.
- PICININI, E.C. ; FERNANDES, J.M. Efeito de fungicidas no controle “in vitro” e “in vivo” de *Bipolaris sorokiniana* e de *Fusarium graminearum*. **Anais, XIX Reunião Anual de Pesquisa de Cevada**. Passo Fundo. Embrapa-Trigo. 1999. pp. 418-422.
- PUNITHALINGHAM, E.; HOLLIDAY, P. *Didymella bryoniae*. CMI. **Descriptions of pathogenic fungi and bacteria**, v.332, 1972.
- RIZZO, A.A.N.; FERREIRA, M.R.; BRAZ, L.T. Ação de acibenzolar-s-methyl (BTH) isolado e em combinação com fungicidas no controle do cancro da haste em melão rendilhado. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 238-240, 2003.
- SHURTLEFF MC, AVERRE CW III. **Glossary of plant pathological terms**. ST. PAUL, MN, USA: APS PRESS. 1997.

TSUTSUMI, C. Y.; SILVA, N. Screening of melon populations for resistance to *Didymella bryoniae* in greenhouse and plastic tunnel conditions. **Braslian Arquivos of Biology and Tecnology**, v. 47, n. 2, p. 171-177, 2004.

UTKHEDE, R.S.; KOCH, C.A. Evaluation of biological and chemical treatments for control of gummy stem blight on cucumber plants grown hydroponically in greenhouses. **BioControl**, v. 49, p. 109–117, 2004.

VANDERPLANK, J. E. Principles of plant infection. New York, NY, USA: Academic Press. 1975.

VAN STEEKELENBURG, N. A. M. Factors influencing internal fruit rot of cucumber caused by *Didymella bryoniae*. **Netherlands Journal of Plant. Pathology**. v. 92, p. 81-91, 1986.

VERSIGNASSI, J. R.; VIDA, J. B.; LORENZETTI, E. R.; FARIA, G. S.; GASPAROTTO, F.; CORTEZ, G. L.; GOMES, R. C. ; CILIATO, F. L. Transmissão de *Didymella bryoniae* por sementes de pepino “partenocárpico”. **Summa Phytopathologica**, v. 30, p. 93, 2004.

VIDA, J. B.; TESSMANN, D. J.; ZAMBOLIM, L.; VERZIGNASSI, J. R.; BRANDÃO FILHO, J. U. T. Controle da podridão gomosa em melão rendilhado por sanitização de ferramenta de poda. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.6, p.626-631, 2004.

VIDA, J. B.; TESSMANN, D. J.; BRANDÃO FILHO, J. U. T.; C, NUNES W. M. Provável transmissão de *Didymella bryoniae* por sementes de melão rendilhado em cultivo protegido. In: **7 Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes**, 2002, Sete Lagoas/MG. 7 Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes - Resumos e Palestras, p. 79, 2002.

WINDHAM, M.T. ; KING, S.B. Microflora of roots of maize at seedling and silking stages in Mississippi. **Plant Disease** 67:1366-1368. 1983.

## **CAPÍTULO IV**

### **CONTROLE QUÍMICO DA PODRIDÃO GOMOSA EM PEPINO PARTENOCÁRPICO**

## RESUMO

No Brasil o pepino partenocárpico (*Cucumis sativus* L.) se constitui numa importante hortaliça, sendo cultivado em ambiente protegido. Várias doenças têm sido importantes para esta cultura. Dentre as doenças fúngicas, a podridão gomosa, causada por *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm], (sinon. *Mycosphaerella melonis*), anamorfo: *Ascochyta cucumis* se constitui num dos maiores problemas fitossanitários para esta cultura, causando grandes danos em condições de epidemias. A principal medida de controle empregada tem sido o uso de fungicidas, contendo poucos registrados para o controle de *D. bryoniae*. Além disso, muitos fungicidas não tem apresentado alta eficiência. Assim, este trabalho objetivou avaliar a eficiência do fungicida piraclostrobina em formulação simples e em mistura com tiofanato metílico no controle de *D. bryoniae* na cultura de pepino partenocárpico, híbrido 'Hokushin', em ambiente protegido. Foram utilizados os seguintes tratamentos: T1 - sementes tratadas com piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil; T2 - sementes não tratadas e mudas pulverizadas a cada dez dias com piraclostrobina; T3 - sementes tratadas com piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil e mudas tratadas a cada dez dias com piraclostrobina; T4 - sementes e mudas não tratadas e cultura pulverizada a cada dez dias com piraclostrobina; T5 - sementes tratadas com piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil e cultura tratadas com piraclostrobina; T6 - muda e cultura tratadas com piraclostrobina; T7 - sementes, mudas e cultura não tratadas; T8 - sementes tratadas com piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil, mudas e cultura tratadas com a cada dez com piraclostrobina. A porcentagem de controle da podridão gomosa, aos 84 dias após o transplante para estufa no período verão-outono, em cada tratamento foi de 38,4; 48,4; 48,0; 47,6; 74,8; 73,8; 0; 70,7%, para T1, T2, T3, T4,, T5, T6, T7 e T8, respectivamente. Não houve sinais e/ou sintomas de podridão gomosa nas plantas de pepino partenocárpico, híbrido 'Hokushin', durante todo ciclo da cultura no período primavera-verão. Nas variáveis produtividade e classificação dos frutos observou-se que, não houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade entre os tratamentos no período primavera-verão. Para o período verão-outono houve diferença significativa entre os tratamentos com a maior produção em peso de 3364,56 g/planta no T8 em que, as sementes, mudas e cultura foram tratadas com fungicida, seguido pelo T5 em que as sementes e cultura foram tratadas. Os resultados mostraram que o tratamento de sementes associado à pulverização da cultura com piraclostrobina constituem eficiente estratégia para o controle da podridão gomosa em pepino partenocárpico híbrido 'Hokushin' cultivado em estufa plástica.

**Palavras-chaves:** *Didymella bryoniae*. *Cucumis sativus*. Tratamento de sementes. Controle químico.

## ABSTRACT

In Brazil the parthenocarpic cucumber (*Cucumis sativus* L.) as an important vegetable crop being cultivated in a greenhouse. Several diseases have been important in this culture. Among the fungal diseases, gummy rot, caused by *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm] (sinon. *Mycosphaerella melonis*), anamorph:*Ascochyta cucumis* constitutes a major health problem for this crop, causing extensive damage in epidemic conditions. The main control measure employed has been the use of fungicides. Few fungicides registered for the control of *D. bryoniae*. In addition, many fungicides has shown high efficiency. This study aimed to evaluate the effectiveness of the fungicide pyraclostrobin in simple formulation and mixed with thiophanate methyl in controlling *D. bryoniae* on cucumber parthenocarpic hybrid 'Hokushin' in a protected environment. We used the following treatments: T1 - seeds treated with pyraclostrobin + thiophanate methyl + fipronil, T2 - untreated seeds and seedlings sprayed every ten days with pyraclostrobin, T3 - seeds treated with pyraclostrobin + + thiophanate methyl and fipronil seedlings treated every ten days with pyraclostrobin, T4 - untreated seeds and seedlings and crop spraying every ten days with pyraclostrobin; T5 - seeds treated with pyraclostrobin + + thiophanate methyl and fipronil culture treated with pyraclostrobin; T6 - changing culture and treated with pyraclostrobin, T7 - seeds , seedlings and untreated culture; T8 - seeds treated with pyraclostrobin + thiophanate methyl + fipronil, culture and seedlings treated with pyraclostrobin every ten. The percentage of rot control gummy, at 84 days after transplanting to greenhouse in summer-autumn period in each treatment was 38.4, 48.4, 48.0, 47.6, 74.8, 73.8 , 0, 70.7% for T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7 and T8, respectively. No signs and / or symptoms of decay gummy parthenocarpic plants of cucumber hybrid "Hokushin", throughout the crop cycle in the spring-summer period. In the variables productivity and classification of fruits was observed that there was no significant difference at 5% probability between treatments in the spring-summer period. For the summer-autumn period was no significant difference in the treatments with the highest production in weight 3364,56 g/plant in T8 in which the seeds and culture were treated, followed by T5 where seed and culture were treated with fungicide. The results showed that seed treatment associated with a foliar spray culture with pyraclostrobin are efficient strategy for the control of brown rot in cucumber gummy parthenocarpic hybrid "Hokushin 'cultivated in greenhouse.

**Keywords:** *Didymella bryoniae*. *Cucumis sativus*. Seed treatment. Chemical control.



## 1. INTRODUÇÃO

Originário da Ásia, o pepineiro (*Cucumis sativus* L.), pertence à família das cucurbitáceas e vem sendo cultivado na Índia há mais de 3000 anos. É uma planta que apresenta resposta intermediária entre as condições tropical e temperada, podendo ser cultivada em ambiente protegido e no campo. O fruto pode ser destinado para mesa ou salada e para a indústria (FONTES; PUIATTI, 2005). O pepineiro do tipo partenocárpico é dentre os produtos hortícolas um dos mais utilizados em sistema protegido, pois apresenta elevado valor econômico na entressafra da região centro-sul (maio a setembro) e ciclo vegetativo curto. Cultivares híbridos do tipo partenocárpico alcançam elevada produtividade neste sistema de cultivo (YOSHIMURA; YOSHIDA; JAMPANI, s.d.).

As doenças fúngicas são fatores limitantes a produção da cultura do pepino, principalmente quando cultivado em ambiente protegido, visto que essa cultura é suscetível ao ataque de inúmeros patógenos, o que torna necessário para seu controle o uso de produtos fitossanitários (JULIATTI, 2001).

A podridão gomosa de cucurbitáceas, causada por *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm é um dos fatores limitantes à produção da cultura do pepino sob ambiente protegido (VIDA et al., 2004), com frequentes danos significativos e, algumas vezes, totais para a cultura (VIDA et al., 1993; VIDA, 1994). Este patógeno tem como hospedeiros diversas espécies de *Citrullus*, *Cucumis*, *Cucurbita* e outros gêneros (KEINATH, 1995).

O fungo *Didymella bryoniae* sobrevive na ausência do hospedeiro sobre e/ou abaixo do solo, nos restos culturais doentes de cucurbitáceas, plantas daninhas ou em sementes. O patógeno é muito resistente ao dessecamento. Assim, os resíduos culturais secos e não decompostos podem servir como fonte de inóculo por mais de um ano (VAN STEEKELENBURG, 1983). Frutos doentes, geralmente, apresentam sementes infectadas, que constituem o principal meio de disseminação e sobrevivência do fungo (SANTOS et al. 2005a). Os ascósporos produzidos pelo patógeno são capazes de resistir a temperaturas inferiores a 0 °C por mais de um ano, em condições de campo, o que significa que mesmo em locais onde o inverno é rigoroso, a capacidade de permanência do patógeno de uma estação de cultivo para outra é bastante grande (VAN STEEKELENBURG, 1983).

O patógeno pode se manter ainda nas sementes infectadas, localizando-se superficialmente ou no interior, no perisperma e tecidos cotiledonares, a importância da infecção de sementes por *D. bryoniae* não está apenas na possibilidade do desenvolvimento

em larga escala da doença, mas também na introdução do inóculo em áreas não infestadas (LEE et al., 1984). A infecção da flor é causada por ascósporos presentes no ar e dependente da umidade. O monitoramento e controle das condições ambientais da casa-de-vegetação poderia, portanto, impedir um surto desta doença (KOCH; UTKHEDE, 2004).

Assim, o controle da podridão gomosa em curcubitáceas tem sido feito principalmente com aplicações regulares de fungicidas (FLETCHER; PREECE, 1966; KEINATH et al., 1995). Porém, na grande maioria das vezes, o controle químico tem apresentado baixa eficiência, devido a rápida infecção das folhas pelo patógeno, quando em condições favoráveis (ARNY; ROWE, 1991; VAN STEEKELENBURG, 1995). Esse fato ocorre devido à resistência e/ou insensibilidade do fungo a determinados princípios ativos, entre os quais o grupo químico dos benzimidazóis e estrobilurina (MALATHRAKIS; VAKALOUNAKIS, 1983; KEINATH, 2009). Deste modo o controle da doença torna-se cada vez mais difícil uma vez que a falta de alternância na utilização de princípios ativos vem causando limitações no manejo da doença (UTKHEDE; KOCH, 2004).

A descoberta do poder fungicida das estrobilurinas representou um significativo desenvolvimento na produção de fungicidas baseados em compostos derivados de fungos. As estrobilurinas representam uma classe relativamente nova de compostos naturais produzidos por fungos da ordem Basidiomycetos pertencentes à espécie *Strobilurus tenacellus* (PARREIRA et al., 2009). Os mesmos autores citam que as estrobilurinas mais comuns são a azoxistrobina, metil-cresoxima, picoxistrobina, fluoxastrobina, orizastrobina, dimoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina.

Piraclostrobina é um fungicida mesostêmico e já se conhece a sua alta eficiência no controle de fungos, taxonomicamente próximos de *D. bryoniae* como, *Septoria* e *Alternaria*. Além disso, piraclostrobina é uma molécula química que induz no hospedeiro alguns efeitos fisiológicos, como redução de síntese de etileno (GROSSMANN; RETZLAFF, 1997) e aumento da atividade de nitrato redutase (“efeito greening”) (KAISER; BRENDLE-BEHNISCH, 1995; FAGAN 2010). Dessa forma, a hipótese é de que piraclostrobina além do efeito fungicida, também pode retardar o aparecimento de sintomas em plantas.

Apesar do relato de fontes moderadas de germoplasma de pepino resistente à *D. bryoniae* (WEHNER; ST. AMAND, 1993; ST. AMAND; WEHNER, 1995a), nenhum gene de resistência foi identificado (PUNITHALINGAM; HOLLIDAY, 1972). Pesquisas realizadas em diferentes regiões do mundo relataram que a resistência aos fungicidas benzimidazóis está estreitamente relacionada com as espécies de *Phoma cucurbitacearum*

(Fr.: Fr) Sacc. [teleomorfo *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm], em cucurbitáceas (MALATHRAKIS; VAKALOUNAKIS, 1983; VAN STEEKELENBURG, 1987; KEINATH; ZITTER, 1998).

Em experimentos realizados a campo, Santos et al. (2005a) testaram fungicidas isolados e em mistura e, observaram que a testemunha apresentou os maiores níveis de intensidade da doença não diferindo estatisticamente dos tratamentos com os fungicidas Tebuconazole, Tiofanato Metílico, Difenconazole e Carbendazim. Por outro lado, as misturas de Tiofanato Metílico + Clorotalonil, Mancozeb + Difenconazole, Trifloxistrobina + Propiconazole e os produtos isolados Mancozeb e Oxicloreto de cobre reduziram significativamente a doença.

Devido à escassez de trabalhos a respeito do controle químico da podridão gomosa em pepino partenocárpico híbrido 'Hokushin' em ambiente protegido, objetivou-se avaliar o controle químico da podridão gomosa na cultura do pepino partenocárpico sob estufa plástica, utilizando-se do tratamento de sementes com fungicida piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil e de pulverização foliar com piraclostrobina em diferentes tratamentos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois ensaios experimentais em estufa plástica tipo túnel alto, localizada no Centro Tecnológico de Irrigação, pertencente ao Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá, (23°25'31'' de latitude Sul, 51°56'19'' de longitude), no período de primavera-verão e verão-outono. O delineamento experimental de cada ensaio foi de blocos ao acaso, constituído por oito tratamentos, quatro repetições e parcela útil composta por seis plantas. Os tratamentos avaliados foram: Tratamento 1 – Plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L) na dose de 1 mg i.a./g de sementes; Tratamento 2 – Plantas originadas de sementes não tratadas e mudas pulverizadas a cada dez dias com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; Tratamento 3 – Plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L) na dose de 1 mg i.a./g de sementes e mudas tratadas a cada dez dias com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; Tratamento 4 – Plantas originadas de sementes e mudas não tratadas e cultura pulverizada a cada dez dias com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; Tratamento 5 – Plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L) na dose de 1 mg i.a./g de sementes e cultura tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; Tratamento 6 – Muda e cultura tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L, Tratamento 7 – Plantas originadas de sementes, mudas e cultura não tratadas (controle negativo); Tratamento 8 – Plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L) na dose de 1 mg i.a./g de sementes, mudas e cultura tratadas com a cada dez com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L (controle positivo).

Para os dois experimentos as sementes comerciais de pepino partenocárpico, híbrido 'Hokushin' foram adquiridas em estabelecimento de comercialização de sementes da cidade de Maringá-PR. As sementes foram semeadas em bandejas de poliestireno de 72 células, contendo substrato comercial a base de casca de *Pinus* sp. carbonizada esterilizado e mantidas em casa-de-vegetação semi-climatizada até serem transplantadas para estufa plástica.

No período primavera-verão a semeadura foi realizada no dia 12/11/2011 e o transplante no dia 29/11/11. A colheita foi iniciada 40 dias após a semeadura, mantendo-se uma periodicidade de três colheitas semanais. A última colheita foi realizada aos 72 dias após a semeadura.

No cultivo verão-outono a semeadura foi realizada no dia 06/02/2012 e o transplante no dia 22/02/2012. A colheita foi iniciada 67 dias após a semeadura, mantendo-se uma periodicidade de três colheitas semanais. A última colheita foi realizada aos 93 dias após a semeadura.

Para os dois experimentos as mudas de pepino partenocárpico foram transplantadas em vasos contendo 12 L de areia lavada de construção sob estufa plástica coberta com polietileno de alta densidade (150 µm), sendo cultivadas em sistema de cultivo semi-hidropônico. Os vasos foram dispostos em linhas, espaçados de 1,0 m entre linhas e de 0,50 m entre vasos, colocando-se uma planta por vaso.

As plantas receberam solução nutritiva composta de um Kit de nutrientes, formulada para a cultura do pepino, utilizando-se para cada 1.000 L de água 1.053 g de nitrato de cálcio, 500 g de sulfato de magnésio hepta-hidratado, 217 g de fosfato monopotássico, 700 g de sulfato de potássio e 30 g de concentrado de micronutrientes contendo Fe-EDTA 7,26%; Cu-EDTA 1,82%; Zn-EDTA 0,73%; Mn-EDTA 1,82%; B 1,82%; Mo 0,36% e Ni 0,335%, por meio de tubo de gotejo, diariamente, nos horários de, 9, 12 e 15 horas, por 5 minutos em cada aplicação.

Na irrigação utilizou-se uma motobomba ligada a um temporizador digital (FDD-60/SBR) que liga e desliga conforme horário programado. Na fase inicial e de maturação de frutos foi utilizado um turno de rega de 15 minutos por dia, aplicando-se uma quantidade de água equivalente a 1 litro de solução nutritiva por vaso por dia. Já na fase de florescimento e frutificação, o turno de rega foi de 30 minutos por dia, que aplicou o equivalente a 2 litros de solução nutritiva por vaso por dia.

As plantas foram conduzidas de acordo com a metodologia descrita por Cañizares (1997), eliminando-se todas as brotações laterais até o quinto nó. As brotações seguintes foram podadas logo após a terceira folha. A poda apical foi efetuada quando as plantas atingiram a altura de 1,80 m.

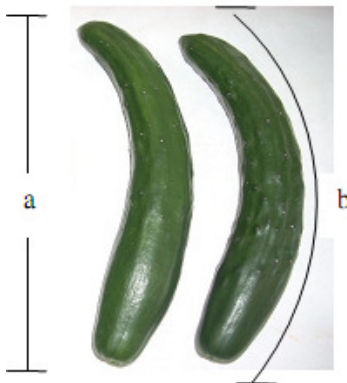
Após a instalação da cultura foram realizadas capinas manuais, quando necessária aplicação dos inseticidas tiametoxam (0,5 g i.a./L), imidaclopride (1,2 g i.a./L) e dissulfan (1,1 g i.a./L) para controle de pragas. Para a pulverização das plantas com inseticida e fungicida utilizou-se um pulverizador costal acionado manualmente com bico cônico. A calda foi preparada de acordo com a dose de cada produto e as plantas foram pulverizadas procurando obter o máximo de cobertura foliar. As pulverizações com o fungicida

piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L foram iniciadas sete dias após o semeio nas plântulas e após o transplante das mudas a cada dez dias.

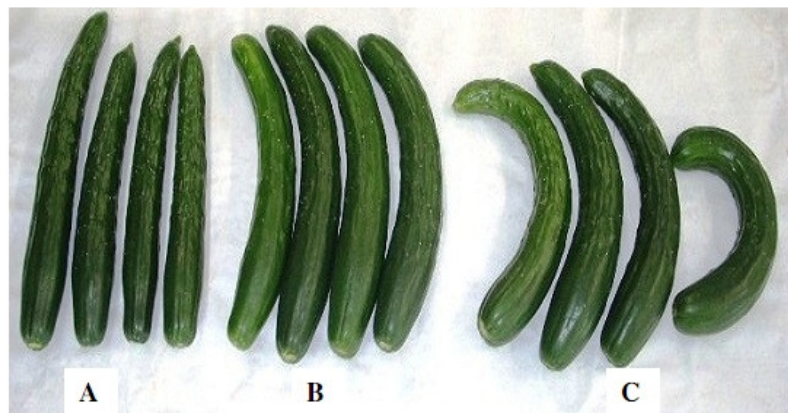
Para os dois ensaios experimentais as avaliações foram realizadas diariamente até o aparecimento dos primeiros sintomas e, a partir de então, foram efetuadas a cada sete dias. Avaliou-se a incidência e a severidade da podridão gomosa. A incidência da podridão gomosa em cada tratamento foi avaliada mediante a contagem do número de plantas com sintomatologia da doença em cada avaliação, e expressa pela porcentagem de plantas doentes em relação ao total de plantas avaliadas em cada tratamento. A severidade da podridão gomosa em cada tratamento foi quantificada medindo-se o maior comprimento longitudinal e a transversal a ele das lesões no caule à medida que estas foram aparecendo. A severidade, em cada planta, foi determinada pela multiplicação das duas dimensões dividido por dois, constituindo a área da lesão, em centímetros quadrados.

Os resultados da incidência e da severidade da podridão gomosa foram utilizados para estabelecer curvas temporais de progresso da doença. Por meio das avaliações da curva de progresso foi possível estimar a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para cada tratamento estudado, através da AACPD.

Foram avaliadas as características: produção e classificação dos frutos. Quando colhidos os frutos apresentaram comprimento entre 20 e 22 cm e diâmetro entre 2 e 3 cm (padrão comercial), foram pesados e classificados em reto, médio (intermediário) ou torto, de acordo com a relação obtida entre a medição do comprimento dos dois lados do fruto, onde reto: relação a/b maior que 0,98; médio: relação a/b entre 0,95 e 0,98; torto: relação a/b menor ou igual a 0,95 (SIRTOLI, 2010).



**Figura 1.** Relação A/B. Distância mais curta entre a base e o ápice do pepino (a) e o lado externo do fruto (b) (Foto: SIRTOLI, 2010).



**Figura 2.** Classificação comercial de pepino “partenocárpico”. A - retos; B - médios/intermediários e c - tortos (SIRTOLI, 2010).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade no programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2003).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Ensaio experimental na primavera-verão

Não ocorreu podridão gomosa nas plantas de pepino partenocárpico, híbrido 'Hokushin', durante todo ciclo da cultura no cultivo primavera-verão. Este fato ocorreu, possivelmente, em função dos fatores climáticos desfavoráveis à doença, basicamente altas temperaturas (média em torno de 31° C) e baixa umidade relativa do ar dentro da estufa plástica (média em torno de 70%). A podridão gomosa é favorecida por temperaturas em torno de 20 a 28°C, com ótimo de 25° C e alta umidade relativa do ar, com ótimo acima de 95 % (PUNITHALINGAM; HOLLIDAY, 1972; SANTOS et al., 2005b).

Desta forma, a ausência de sintomas visíveis nas plantas de pepino partenocárpico indica que *D. bryoniae* poderia estar em infecção latente nas plantas e os sintomas só se manifestem se os níveis de temperatura e umidade retornarem às condições favoráveis à atividade do patógeno.

Resultados similares foram encontrados por Maraus (2013) que obteve na safra de verão, 100% de controle da severidade de *D. bryoniae* em plantas de pepino partenocárpico conduzidos sob sistema hidropônico. Já na safra de inverno, obteve 24,63% de controle da doença. O mesmo autor ainda ressalta que, as diferenças de severidade encontradas entre as safras de verão e inverno podem decorrer, certamente das diferenças nas condições do ambiente interno do cultivo protegido entre estes dois períodos, principalmente temperatura e umidade relativa do ar.

Assim, acredita-se que no período primavera-verão, a doença pode ter sido desfavorecida pela alta temperatura e baixa umidade relativa do ar. Enquanto no período verão-outono, o ambiente com maior umidade do ar e temperaturas amenas favoreceu, inicialmente, a manifestação dos sintomas de *D. bryoniae* em plantas de pepino partenocárpico.

Quanto às variáveis produtividade e classificação dos frutos observou-se que não houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade entre os tratamentos (Tabela 1). Quando o experimento foi conduzido no período de primavera-verão observou-se menor produtividade em relação ao cultivo verão-outono. Galvani et al. (2000) ao avaliar a produtividade do pepineiro (híbrido Hokuho) cultivado em ambiente protegido e a campo em



ciclos de outono-inverno e primavera-verão verificou influência positiva apenas do ambiente protegido no ciclo de outono-inverno, obtendo produtividade de 19,98 kg m<sup>-2</sup>.

Observou-se também maior precocidade para início da colheita do pepino partenocárpico híbrido 'Hokushin' no período primavera-verão, a qual ocorreu aos 40 dias após a semeadura, comparado ao cultivo verão-outono a qual ocorreu aos 67 dias após a semeadura. Resultados semelhantes foram encontrados por Cardoso e Silva (2003) que observaram maior precocidade para início da colheita pelo híbrido Hokushin aos 45 dias após a semeadura no cultivo de verão. Enquanto no cultivo de inverno, o início da colheita ocorreu após 72 dias da semeadura.

**Tabela 1.** Produção e classificação dos frutos de pepino partenocárpico, híbrido 'Hokushin', cultivado em estufa plástica, usando semi-hidroponia em areia lavada, período primavera-verão

<sup>1</sup> Tratamento	Produção (g/planta)	Classificação dos frutos (%)		
		Reto	Intermediário	Curvo
1	2539,9	39,2*	44,1*	16,7*
2	2698,9	45,2	37,3	17,5
3	2715,3	37,7	39,1	23,2
4	2817,9	44,2	35,0	20,8
5	2760,6	39,4	36,5	24,1
6	2691,9	45,1	38,1	16,8
7	2435,1	41,2	39,5	19,3
8	2815,2	43,1	39,0	17,9
C.V.	15,99	18,98	23,54	25,23

\*NS – não significativo

<sup>1</sup>Tratamentos: T1 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes; T2 - plantas originadas de sementes não tratadas e mudas pulverizadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T3 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes e mudas tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T4 – plantas originadas de sementes e mudas não tratadas e cultura pulverizada com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T5 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes e cultura tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T6 – mudas e cultura tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T7 – plantas originadas de sementes, mudas e cultura não tratadas (controle negativo); T8 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes, mudas e cultura tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L (controle positivo).

Outro aspecto evidenciado é que o estado fitossanitário superior das plantas, principalmente devido à ausência de *D. bryoniae*, neste período (primavera-verão) em comparação com o cultivo verão-outono, promoveu a ampliação do período de colheita no verão.

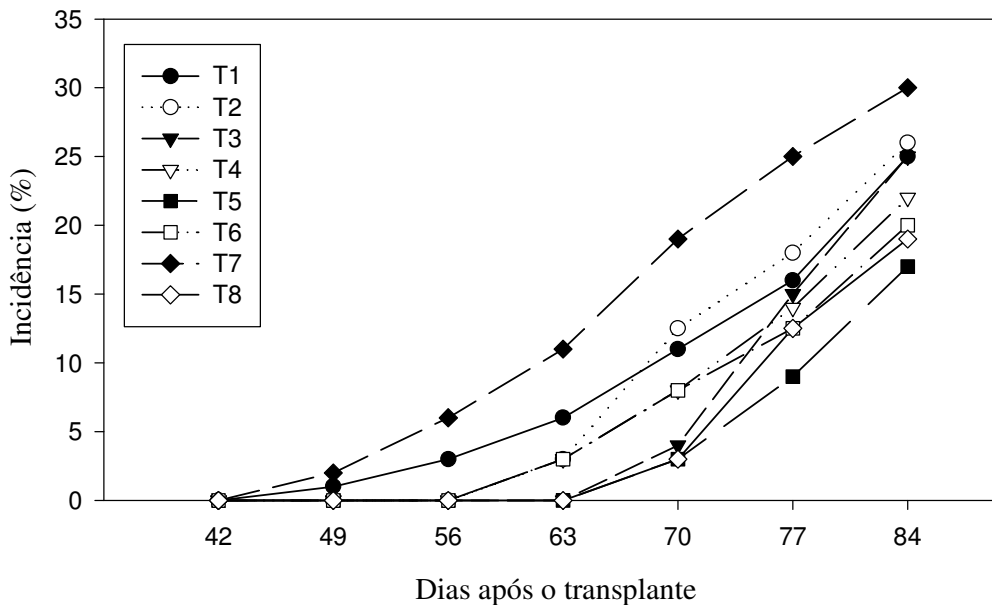
### 3.2. Ensaio experimental no verão-outono

Os primeiros sintomas de podridão gomosa foram constatados aos 42 dias após o transplante das mudas (DAT) em plantas no tratamento testemunha (sementes não tratadas e plantas não pulverizadas com fungicida). Aos 42 DAT também observaram-se os primeiros sintomas da doença em plantas de pepino, as quais, as sementes foram tratadas com o fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes, evidenciando que somente o tratamento de sementes não foi eficiente na erradicação do patógeno *D. bryoniae*. Por outro lado, observou-se o aparecimento de sintomas da doença mais tardiamente, aos 63 DAT para os tratamentos T3, T5 e T8, em que, nestes tratamentos as sementes foram tratadas com o fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes, além da pulverização das mudas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L, no tratamento T3 e T8, e pulverização da cultura com piraclostrobina nos tratamentos T5 e T8 (Figura 3).

A partir dos 56 dias, os primeiros sintomas de podridão gomosa foram evidenciados para o tratamento T2 em que, somente as mudas foram pulverizadas, T4 onde a cultura foi pulverizada com piraclostrobina e T6 no qual as mudas e a cultura foram tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L.

A maior incidência de podridão gomosa ocorreu no tratamento testemunha (sementes, mudas e cultura não pulverizadas com fungicidas - T7, com incidência de 31% e a menor incidência foi para o tratamento constituído de aplicação de piraclostrobina via sementes e pulverizações da cultura (T5), com incidência de 16% seguido do tratamento constituído de aplicação do fungicida via sementes, pulverização de mudas e pulverizações da cultura (T8) e finalmente seguido pelo tratamento constituído de aplicação do fungicida via pulverização de mudas e da cultura (T6). Estes resultados mostraram o efeito benéfico do tratamento de sementes associado à pulverização na redução da incidência de podridão gomosa em pepino partenocárpico (Figura 3). Estes resultados mostraram também que a

pulverização das mudas antes do transplante, promoveu proteção das plantas nos estágios iniciais de implantação da cultura na estufa plástica e atrasou o estabelecimento do patógeno.



**Figura 3.** Incidência de podridão gomosa em pepino partenocárpico (híbrido 'Hokushin') em estufa plástica sob os tratamentos: T1 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes; T2 - plantas originadas de sementes não tratadas e mudas pulverizadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T3 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes e mudas tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T4 – plantas originadas de sementes e mudas não tratadas e cultura pulverizada com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T5 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes e cultura tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T6 – mudas e cultura tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T7 – plantas originadas de sementes, mudas e cultura não tratadas (controle negativo); T8 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes, mudas e cultura tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L (controle positivo). Cultivo verão-outono, Maringá, 2012.

A porcentagem de controle da podridão gomosa, para os tratamentos T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7 e T8, aos 84 DAT foi de 38,4; 48,4; 48,0; 47,6; 74,8; 73,8; 0; 70,7 %, respectivamente. A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Tabela 2) foi maior no tratamento testemunha.

**Tabela 2.** Eficiência de fungicidas no controle de podridão gomosa em plantas de pepino partenocárpico, híbrido ‘Hokushin’ cultivadas em verão-outono, em ambiente protegido, expressada pela área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD)

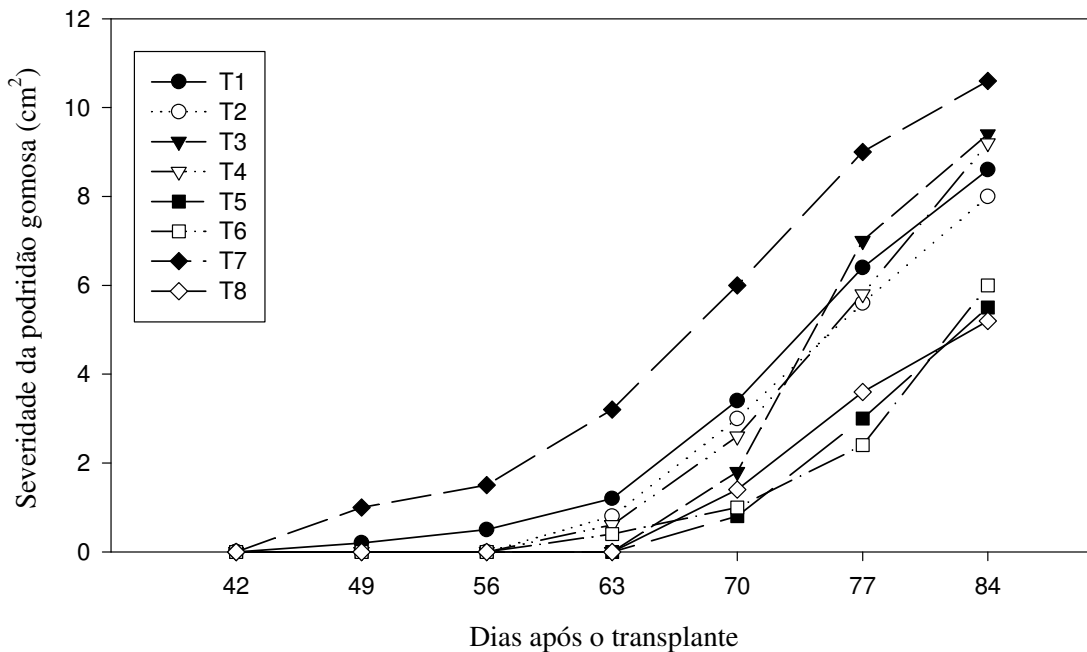
Tratamento <sup>1</sup>	AACPD	% Controle
1	112,0 c	38,4
2	93,8 c	48,4
3	94,5 c	48,0
4	95,2 c	47,6
5	45,85 b	74,8
6	47,6 b	73,8
7	182 a	0
8	53,2 b	70,7
C.V.	21,5	

<sup>1</sup>. T1 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes; T2 - plantas originadas de sementes não tratadas e mudas pulverizadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T3 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes e mudas tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T4 – plantas originadas de sementes e mudas não tratadas e cultura pulverizada com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T5 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes e cultura tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T6 – mudas e cultura tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T7 – plantas originadas de sementes, mudas e cultura não tratadas (controle negativo); T8 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes, mudas e cultura tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L (controle positivo).

A maior severidade da doença foi observada nas plantas em que não houve pulverizações (Figura 4). Nos tratamentos em que as mudas e cultura foram pulverizadas (T6) e plantas em que as sementes foram tratadas, mudas e culturas pulverizadas (T8) observou-se que, a doença desenvolveu-se mais lentamente e com menor intensidade. Para os tratamentos T3, T5 e T8 os primeiros sintomas de podridão gomosa foram observados aos 63 dias após o transplante das mudas de meloeiro nobre. Assim, evidencia-se que a associação do tratamento de sementes com as pulverizações foliares foi eficiente em reduzir a intensidade da doença. Isto mostra a importância que se deve dar a combinação dessas técnicas, aliado a outros métodos de manejo no controle da podridão gomosa.

Segundo Barlett et al. (2001) as estrobilurinas atuam na respiração mitocondrial dos fungos bloqueando a transferência de elétrons pelo complexo citocromo Bc1, através da

inibição da óxido-redutase de ubihidroquinona-citocromo c (GHINI; KIMATI, 2002), reduzindo o processo respiratório e bloqueando o fornecimento de energia das células do fungo e levando à sua morte



**Figura 4.** Severidade da podridão gomosa em pepino partenocárpico (híbrido ‘Hokushin’) em estufa plástica sob os tratamentos: T1 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes; T2 - plantas originadas de sementes não tratadas e mudas pulverizadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T3 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes e mudas tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T4 – plantas originadas de sementes e mudas não tratadas e cultura pulverizada com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T5 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes e cultura tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T6 – plantas originadas de muda e cultura tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T7 – plantas originadas de sementes, mudas e cultura não tratadas (controle negativo); T8 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes, mudas e cultura tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L (controle positivo). Cultivo verão-outono, Maringá, 2012.

Gasparotto (2010) obteve resultados semelhantes ao deste trabalho para o controle da podridão gomosa em plantas de meloeiro nobre híbrido Sunrise. A mesma autora utilizando-se do tratamento de sementes com carbenazim + tiram associado à pulverização na cultura com o fungicida epoxiconazol + piraclostrobina, obteve eficiente controle da podridão gomosa em meloeiro nobre cultivado em estufa plástica.

Penharbel (2011) obteve eficiente controle da podridão gomosa em plantas de meloeiro nobre quando, mudas e culturas foram pulverizadas com o fungicida piraclostrobina+epoxiconazol, com porcentagem de controle da podridão gomosa de 55,9%.

Segundo Tofoli (2002), além da ação fungicidas, as moléculas de estrobilurinas atuam de forma positiva sobre a fisiologia das plantas, através de aumentos da atividade da enzima nitrato redutase, níveis de clorofila e da redução da produção de etileno. Tais efeitos contribuem diretamente para que as plantas sofram menor estresse no campo, assegurando melhor qualidade e rendimento das colheitas. Jabs (2004) ainda ressalta que quanto mais cedo a estrobilurina for aplicada, melhor será a resposta fisiológica, respondendo positivamente sob condições de estresse.

Assim, a aplicação da estrobilurina neste experimento possibilitou o atraso na senescência das folhas em comparação com as plantas dos tratamentos onde não se aplicou o fungicida, evidenciando possível efeito fisiológico do produto aplicado. Esse atraso levou a um progresso mais lento da doença nos tratamentos pulverizados, resultando na redução da severidade da doença ao final do experimento. Em plantas de meloeiro nobre de diferentes híbridos, Gasparotto (2006), evidenciou o início dos primeiros sintomas de podridão gomosa com a senescência das folhas cotiledonares destas plantas.

Segundo Venâncio et al. (2005), a interferência benéfica dos fungicidas nos processos metabólicos das plantas, controlam de forma eficaz as principais doenças, fazendo com que a planta complete o seu ciclo produtivo, assegurando a produção esperada. A partir do lançamento das estrobilurinas, e com a evolução deste grupo de produtos químicos, o conceito de controle ganha novas perspectivas, principalmente considerando as vantagens obtidas pela ação de efeitos fisiológicos positivos deste sobre as plantas (VENÂNCIO et al., 2004).

No Brasil, Santos et al. (2006) detectaram a existência de resistência de isolados de *D. bryoniae* a tiofanato metílico, carbendazim e tiofanato metílico+clorotalonil. Os autores relataram, porém, que *D. bryoniae* apresentou sensibilidade a outros grupos de fungicidas, tais como os triazóis (tebuconazole, difenoconazole), estrobilurinas em mistura com triazóis

(trifloxistrobina + propiconazole), ao grupo ditiocarbamato em mistura com triazóis ou ditiocarbamato utilizado isoladamente (mancozebe+difenoconazole, mancozebe, respectivamente) e também ao oxiclreto de cobre.

A eficiência de triazóis e estrobirulinas no controle da podridão gomosa em cucurbitáceas como melão, melancia e pepino foi estabelecida em diversos trabalhos que destacam, também, a necessidade da utilização de outros princípios ativos para evitar o desenvolvimento de isolados resistentes do patógeno (VAWDREY, 1994; UTKHEDE; KOCH, 2002; 2004; SANTOS et al., 2006; KEINATH et al., 2007).

Para retardar o desenvolvimento de resistência de *D. bryoniae* aos fungicidas, além da utilização de alternância de produtos com diferentes princípios ativos, pode-se adotar práticas que retardam o início ou a progressão de epidemias, tais como rotação de culturas, destruição de restos culturais infestados e uso de fungicida em aplicação de prevenção. Com essas práticas, o tamanho da população do patógeno expostos ao fungicida é reduzido, o que deve reduzir o risco de seleção de indivíduos resistentes.

Assim, a aplicação do fungicida piraclostrobina teve efeito positivo no controle da doença, porém, o mesmo deve ser utilizado associado a outras técnicas de controle e com alternância com outros fungicidas de outros grupos químicos para que se obtenha melhor eficiência de controle e para evitar a resistência do patógeno aos ingredientes ativos.

Apesar da diferença, entre os tratamentos quanto à severidade e incidência de podridão gomosa, nenhuma diferença foi observada para a classificação dos frutos. Na variável produção (g/planta) observou-se diferença significativa entre os tratamentos, ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 3).

A maior produção em peso (g/planta) foi observado no tratamento 8 (sementes, mudas e cultura tratada) de 3364,56 g/planta (Tabela 3). Valores maiores de produção foram obtidos por Cardoso e Silva (2003) que avaliando diferentes híbridos de pepino partenocárpico sob ambiente protegido em duas épocas de cultivo, observou produção total de 4535,4 g/planta no período verão-outono. O mesmo autor obteve resultados próximos ao deste trabalho para a produção do híbrido 'Hokushin' no período de verão de 2885,5 g/planta. Os tratamentos que apresentaram menor produção foram T1, T2 e T7 com 2036,87; 2201,25 e 1851,25 g/planta.

**Tabela 3.** Produção e classificação dos frutos de pepino partenocárpico híbrido ‘Hokushin’ cultivado em estufa plástica, usando semi-hidroponia em areia lavada, período verão-outono

*Tratamento	Produção (g/planta)	Classificação dos frutos (%)		
		Reto	Intermediário	Curvo
1	2436,8 b <sup>1</sup>	45,6	35,0	19,4
2	2801,2 b	43,8	39,1	17,1
3	3191,8 a	53,7	29,3	17,0
4	3229,0 a	50,1	28,7	21,2
5	3298,1 a	42,5	31,8	25,7
6	3195,6 a	43,4	30,4	26,2
7	2451,2 b	44,2	27,5	28,3
8	3364,5 a	51,0	28,4	20,6
C.V.	21,65	19,41	24,37	17,80

\*Tratamentos: T1 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes; T2 - plantas originadas de sementes não tratadas e mudas pulverizadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T3 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes e mudas tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T4 – plantas originadas de sementes e mudas não tratadas e cultura pulverizada com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T5 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes e cultura tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T6 – plantas originadas de muda e cultura tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L; T7 – plantas originadas de sementes, mudas e cultura não tratadas (controle negativo); T8 – plantas originadas de sementes tratadas com fungicida piraclostrobina (25 g/L) + tiofanato metílico (225 g/L) + fipronil 250 (g/L), na dose de 1 mg i.a./g de sementes, mudas e cultura tratadas com piraclostrobina (250 g/L) na dose de 0,1 g i.a./L (controle positivo). <sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra, na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-knott, em nível de 5% de probabilidade.

Neste estudo, os resultados mostraram que o tratamento de sementes associado com pulverizações com fungicidas na cultura constituem em métodos eficientes para o controle da podridão gomosa em pepino partenocárpico híbrido ‘Hokushin’ cultivado em ambiente protegido.



#### **4. CONCLUSÃO**

Para as condições em que o trabalho foi desenvolvido conclui-se que:

A incidência e severidade de podridão gomosa em plantas de pepino partenocárpico híbrido 'Hokushin' foram reduzidas nas plantas em que as sementes foram tratadas e a cultura pulverizada com piraclostrobina em cultivo protegido.

## REFERÊNCIAS

- AMAND, P.C.; WEHNER, T. C. Greenhouse, detached-leaf, and field testing methods to determine cucumber resistance to gummy stem blight. **Journal American Society of Horticultural Science**. v.120: p.673–680, 1995.
- ARNY, C. J., ROWE, R. C. Effects of temperature and duration of surface wetness on spore production and infection of cucumbers by *Didymella bryoniae*. **Phytopathology**, v.81, n.2, p.206-209, 1991.
- BARLETT, D. W.; CLOUGH, J. M.; GODFREY, C. R. A.; GODWIN, J. R.; HALL, A. A.; HEANEY, S. P.; MAUND, S. J. Understanding the strobilurin fungicides. **Pesticide Outlook**, Cambridge, v. 12, n. 4, p.143-146, 2001.
- CAÑIZARES, K.A.L. **Efeito da enxertia de híbridos de pepino (*Cucumis sativus* L.) em dois híbridos de abóbora (*Cucurbita* sp.) sob ambiente protegido**.1997. 80p. (Dissertação Mestrado), UNESP, Botucatu.
- CARDOSO, A. I.; SILVA, N. Avaliação de híbridos de pepino tipo partenocárpico sob ambiente protegido em duas épocas de cultivo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v.21, n.2, p.170-175, 2003.
- FAGAN, E.B. et al. Efeito da aplicação de piraclostrobina na taxa fotossintética, respiração, atividade da enzima nitrato redutase e produtividade de grãos de soja. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 4, 2010.
- FERREIRA, D. F. **Sisvar**: Sistema para análise de variância para dados balanceados versão 4.2. Lavras: UFLA, 2003.
- FLETCHER, J. T.; PREECE, T. F. *Mycosphaerella* stem rot of cucumbers in the Lea Valley. **Ann. appl. Biol**, v.58, p.423-430, 1966:
- FONTES, P. C. R.; PUIATTI, M. Cultura do pepino. In: FONTES, P. C. R. **Olericultura: teoria e prática**. Viçosa: Suprema, 2005. p.439-455.
- GASPAROTTO, F. **Avaliação da sanidade de sementes de híbridos de meloeiro nobre indicados para cultivo protegido**. Maringá: UEM, 42p (Tese de Mestrado), 2006.
- GASPAROTTO, F. **Transmissão e controle de *Didymella bryoniae* em meloeiro nobre**, Maringá: UEM, p. 93-114. (Tese de doutorado), 2010.
- GALVANI, E.; ESCOBEDO, J. F.; CUNHA, A. R. DA.; KLOSOWSKI, E. S. Estimativa do índice de área foliar e da produtividade de pepino em meio protegido-cultivo de inverno e de verão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.4, n.1, p.8-13, 2000.
- GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. 2.ed. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2002. 78 p.

GROSSMANN, K.; RETZLAFF, G. Bioregulatory effects of the fungicidal strobilurin kresoxim methyl in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Pesticide Science**, v.50, p.11-20, 1997.

JABS, T. Can strobilurins still deliver? **Crop Protection**, v. 17, april, 2004. p.19-20  
JULIATTI, F.C. Manejo integrado de fungos fitopatogênicos. In: SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, J.R.; NOJOSA, G.B.A. (Org.). **Manejo integrado de doenças: doenças e pragas em hortaliças**. Lavras: UFLA, 2001. p.159-220.

KAISER, W.M.; BRENDLE-BEHNISCH, E. Acid-base-modulation of nitrate reductase in leaf tissues. **Planta**, v.196, p.1-6, 1995.

KEINATH, A.P.; FARNHAM, M.W.; ZITTER, T.A. Morphological, pathological, and genetic differentiation of *Didymella bryoniae* and *Phoma* spp. Isolated from cucurbits. **Phytopathology**, v.85, p.364-369, 1995.

KEINATH, A.P.; HOLMES, G.J.; EVERTS, K.L.; EGEL, D.D.; LANGSTON JR., D.B. Evaluation of combinations of chlorothalonil with azoxystrobin, harpin, and disease forecasting for control of downy mildew and gummy stem blight on melon. **Crop Protection**, v. 26, p. 83-88, 2007.

KEINATH, A.P.; ZITTER, T.A. Resistance to Benomyl and Thiophanate-methyl in *Didymella bryoniae* from South Carolina and New York. **Plant Disease**, St. Paul, v.82, p.479-84, 1998.

KEINATH, A. P. Sensitivity to azoxystrobin in *Didymella bryoniae* isolates collected before and after field use of strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, v.65, p.1090-1096, 2009.

KOCH, C. A.; UTKHEDE, R. S. Development of a Multiplex classical Polymerase chain reaction technique for detection of *Didymella bryoniae* in infected cucumber tissues and greenhouse air samples. **Canadian Journal Plant Pathology**, v.26, p. 291-298, 2004.

LEE, H.; MATHUR, S. B.; NEERGAARD, P. Detection and location of seed-borne inoculum of *Didymella bryoniae* and its transmission in seedlings of cucumber and pumpkin. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.109, p.301-308, 1984.

MALATHRAKIS, N.E. ; VAKALOUNAKIS, D.J. Resistance to benzimidazole fungicides in the gummy stem blight pathogen *Didymella bryoniae* on cucurbits. **Plant Pathology** , v.32: p.395-399, 1983.

MARAUS, P. F. **Efeito de sistemas de cultivo e de fungicida na severidade de doenças fúngicas em pepino partenocárpico (*Cucumis sativus* L.) em ambiente protegido**. Maringá: UEM, 64p. (Tese de Mestrado), 2013.

PARREIRA, D. F.; NEVES, W. S.; ZAMBOLIM, L. Resistência de fungos a fungicidas inibidores de quinona. **Revista Trópica: ciências agrárias e biológicas**, Chapadinha, v. 3, n. 2, p. 24-34, 2009.

- PENHARBEL, M. P. **Efeito de sistemas de cultivo e de fungicidas sobre a podridão gomosa (*Didymella bryoniae*) em meloeiro cultivado em ambiente protegido.** Maringá: UEM, 81p. (Tese de Mestrado), 2011.
- PUNITHALINGHAM, E.; HOLLIDAY, P. *Didymella bryoniae*. CMI. **Descriptions of pathogenic fungi and bacteria**, v.332, 1972.
- SANTOS, G. R.; CAFÉ-FILHO, A. C.; SABOYA, L. M. F. Controle químico do cretamento gomoso do caule na cultura da melancia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p.155-163, 2005a.
- SANTOS, G. R.; CAFÉ FILHO, A. C. Reação de genótipos de melancia ao cretamento gomoso do caule. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.4, p.945-950, 2005b.
- SANTOS, G. R.; CAFÉ-FILHO, A. C.; REIS, A. Resistência de *Didymella bryoniae* a fungicidas no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 476-482, 2006.
- SIRTOLI, L. F. **Fisiologia do pepineiro partenocárpico, com e sem enxertia, tratado com fungicida boscalida.** 2010. 105p. Tese (doutorado), UNESP, Botucatu.
- UTKHEDE R.S.; KOCH, C.A. Evaluation of biological and chemical treatments for control of gummy stem blight on cucumber plants grown hydroponically in greenhouses. **BioControl**, Netherlands, v.49, p.109–117, 2004.
- TOFOLI, J. G. **Ação de fungicidas e acibenzolar-s-methyl no controle da pinta preta do tomateiro.** 2002. 127 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.
- VAN STEEKELEMBURG, N. A. M. Influence of humidity on incidence of *Didymella bryoniae* on cucumber leaves and growing points under controlled environmental conditions. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.91, p.253-264, 1995.
- VAN STEEKELEMBURG, N. A. M. Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in *Botrytis cinerea* and *Didymella bryoniae* in cucumbers in the Netherlands. **Mededelingen Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent**, v.52, p.875-880, 1987.
- VAN STEEKELEMBURG, N.A.M. Epidemiological aspects of *Didymella bryoniae*, the cause of stem and fruit rot of cucumber. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.89, p.75-86, 1983.
- VAWDREY, L. Evaluation of fungicides and cultivars for control of gummy stem blight of rockmelon caused by *Didymella bryoniae*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 34, p. 1191-1195, 1994.
- VENÂNCIO, W. S.; RODRIGUES, M. A. T.; BEGLIOMINI, E.; SOUZA, N. L. Efeitos fisiológicos de fungicidas sobre plantas. 1. Efeitos fisiológicos do fungicida pyraclostrobin. In: Luz, W. C.; Fernandes, J. M.; Prestes, A. M.; Picinini, E. C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 2004, v.12, p.317-341.

VENÂNCIO, W. S.; RODRIGUES, M. A. T.; BEGLIOMINI, E.; SOUZA, N. L. PERES, N. A. Efeitos fisiológicos de fungicidas sobre plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 2005, v.13, p.49-73.

VIDA, J. B., SOUTO, E. R.; NUNES, W. M. C. Perdas causadas por *Mycosphaerella melonis* na cultura do melão em estufas plásticas. **Fitopatologia Brasileira**, v.18, p. S324, 1993.

VIDA, J.B. **Manejo de doenças em cultivos protegidos**. In: Brandão Filho, J.U.T., Contiero, R.L. ; Andrade, J.M.B. Cultivo protegido: Encontro de Hortaliças da Região Sul, 9, Encontro de Plasticultura da Região Sul, 6, Maringá, p.25-30, 1994.

VIDA, J. B.; TESSMANN, D. J.; ZAMBOLIM, L.; VERZIGNASSI, J. R.; BRANDÃO FILHO, J. U. T. Controle da podridão gomosa em melão rendilhado por sanitização de ferramenta de poda. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.6, p.626-631, 2004.

WEHNER, T.C.; AMAND, P.C. Field test for resistance to gummy stem blight of cucumber in North Carolina. **Hortscience**, v.28: p.327–329, 1993.

YOSHIMURA, A. M.; YOSHIDA, A.; JAMPANI, M. G. **Plasticultura: uma nova tecnologia**. Biritiba Mirim: s.n, s.d. 79 p.

## **CAPÍTULO V**

### **EFEITO DA ENXERTIA NO CONTROLE DA PODRIDÃO GOMOSA EM PEPINO PARTENOCÁRPICO**

## RESUMO

A podridão gomosa, causada por *Didymella bryoniae* é uma das doenças mais importantes para a cultura de pepino partenocárpico, podendo causar grandes danos sob condições de epidemias. O controle dessa doença tem sido frequentemente efetuado com aplicações de fungicidas e poucos trabalhos foram desenvolvidos avaliando medidas alternativas de controle, como a enxertia. Por isso, estudos que quantificam a eficiência de medidas alternativas são importantes. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da enxertia no controle da podridão gomosa em plantas de pepino partenocárpico, híbrido Hokushin, enxertadas em abóbora Shelper imune à *D. bryoniae*. Os resultados mostram que houve efeito da enxertia na redução da dimensão das lesões de podridão gomosa. Para as plantas inoculadas no hipocótilo do enxerto e as inoculadas na região de união enxerto/porta-enxerto, as lesões atingiram área de 3,45 e 2,57 cm<sup>2</sup>, respectivamente. Nas plantas pé-franco a área média de lesão foi de 4,21 cm<sup>2</sup>. Quando o patógeno foi inoculado no caule do porta-enxerto nenhum sintomas da doença ocorreu.

**Palavras-chave:** *Cucumis sativus*. *Didymella bryoniae*. Enxertia. Manejo integrado.

## ABSTRACT

The gummy rot, caused by *Didymella bryoniae* is one of the most important diseases for the cultivation of parthenocarpic cucumber, causing extensive damage under epidemic conditions. Control of this disease has often been done with fungicide applications were developed and few studies evaluating alternative measures of control. Therefore, studies that quantify the efficiency of alternative measures are important. The objective of this study was to evaluate the effect of grafting on rot control gummy in parthenocarpic cucumber plants, hybrid Hokushin, grafted on squash Shelper immune to *D. bryoniae*. The results show that the graft was no effect of reducing the size of lesions gummy rot. For plants inoculated in the hypocotyl graft and inoculated in the region of union graft / rootstock, injuries hit area of 3.45 and 2.57 cm<sup>2</sup>, respectively. In plants ungrafted the average lesion area was 4.21 cm<sup>2</sup>. When the pathogen was inoculated on the stem of the rootstock no symptoms of the disease occurred.

**Keywords:** *Cucumis sativus*. *Didymella bryoniae*. Grafting. Integrated management.



## 1. INTRODUÇÃO

Pepino partenocárpico é uma das hortaliças mais cultivadas em ambiente protegido, na região sul do Brasil, proporcionando alto valor agregado no agronegócio da pequena propriedade, principalmente em estações de baixas temperaturas (LIMA et al., 2000). O uso dessa técnica proporciona ao produtor a possibilidade de produzir, durante o ano todo, frutos de excelente qualidade comercial, sendo boa alternativa econômica, pois reduz as perdas e aumenta a produtividade, o que resulta em aumento na lucratividade, quando comparado ao cultivo em campo, ocasionado pelo aumento da eficiência fotossintética dessas plantas (BLANCO; FOLEGATTI, 2002; CAÑIZARES et al., 2004). Dentre os híbridos de pepineiros cultivados em ambiente protegido, destacam-se “Hokushin”, ‘Tsuyataro’, ‘Natsubayashi’ e ‘Samurai’ (VIDA et al., 2004).

Na Região Norte do Estado do Paraná, epidemias de podridão gomosa, causada por *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm na cultura do pepino têm ocorrido, frequentemente em estufas plásticas, sendo uma das doenças mais destrutivas que ocorrem em cultivos protegidos de espécies de cucurbitáceas. A principal estratégia de controle tem sido o uso de fungicidas. No entanto outras medidas de controle, que estão associadas às técnicas de cultivo e não envolvem acréscimo de custos podem apresentar significativas reduções na severidade de podridão gomosa. Uma dessas medidas é o uso da enxertia. De acordo com Canizares et al. (1996), todo pepino partenocárpico comercializado na Central de Abastecimento de São Paulo (CEAGESP) é produzido usando a técnica de enxertia; além de melhorar a rusticidade das plantas, os frutos apresentam características organolépticas diferenciadas (SANTOS; GOTO, 2003; PIEL, 2003). O emprego de porta-enxertos imunes ou com alta resistência a *D. bryoniae* e que esse efeito seja transmitido para o enxerto pode contribuir para redução da intensidade de podridão gomosa na cultura.

A utilização da enxertia empregando porta-enxerto imune para o controle de patógenos radiculares tem sido recomendada para alguns patossistemas olerícolas, como *Ralstonia solanacearum*-tomate, *R. solanacearum*-pimentão, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-tomate e *Verticillium* spp.-berinjela (PEIL, 2003); pepino (COSTA et al., 2001), melão rendilhado (RIZZO et al., 2004), pimentão (SANTOS; GOTO, 2004) e pimentão e pimentas (OLIVEIRA et al., 2009). Na produção de pepino partenocárpico em ambiente protegido, esta técnica tem sido considerada, como um método alternativo de produção, visando diminuir os riscos de insucesso, além de proporcionar efeitos positivos na qualidade

dos frutos de pepino, que perdem a cerosidade característica, quando as plantas são enxertadas em porta-enxertos específicos, melhorando a aparência com ganhos significativos no valor comercial (KAWAIDE, 1985; FUJIEDA, 1986; CAÑIZARES; GOTO, 1998).

Apesar dos efeitos significativos da enxertia no controle de patógenos radiculares, raros foram os trabalhos desenvolvidos tratando do efeito dessa técnica na redução da intensidade de doenças da parte aérea (GASPAROTTO, 2010). Como na cultura de pepino partenocárpico tem sido empregado porta-enxerto imune a *D. bryoniae* torna-se importante prospectar sobre a transferência desse efeito para o enxerto e quantificá-lo quanto à redução na severidade de podridão gomosa. Para cultura de melão rendilhado, o uso de porta-enxerto inume a *D. bryoniae* reduziu a severidade de podridão gomosa em até 38,0 % (GASPAROTTO, 2010). Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da enxertia no controle da podridão gomosa em plantas de pepino “japonês” híbrido “Hokushin” enxertadas em abóbora imune à *D. bryoniae*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Ensaio Experimental em casa-de-vegetação

O ensaio foi desenvolvido em casa-de-vegetação semi-climatizada localizada na Universidade Estadual de Maringá, no Departamento de Agronomia.

#### 2.1.1. Obtenção do isolado de *D. bryoniae*

O isolado de *D. bryoniae* empregado foi obtido de plantas de pepineiro com sintomas de podridão gomosa, com patogenicidade comprovada após a obtenção da cultura pura 'in vitro'. O isolado foi mantido em meio de cultivo batata-dextrose-ágar em câmara de incubação à temperatura de 24 °C e 12 horas de fotoperíodo.

#### 2.1.2. Produção das mudas

As mudas do híbrido de pepino partenocárpico e de abóbora Shelper foram produzidas em bandejas de poliestireno de 128 células, as quais foram preenchidas com substrato a base de casca de *Pinus* sp. carbonizada. A semeadura do porta-enxerto foi realizada quatro dias após a semeadura do pepineiro. A enxertia foi realizada quando o porta-enxerto e a copa apresentaram a primeira folha verdadeira.

Utilizou-se o método de enxertia de fenda cheia (CAÑIZARES; GOTO, 2003), tendo como enxerto o híbrido de pepino partenocárpico e como porta-enxerto o híbrido de abóbora Shelper, por ser um dos mais utilizados na enxertia de cucurbitáceas, sendo indicado para pepino partenocárpico híbrido 'Hokushin' e, principalmente, por ser imune à *D. bryoniae* (ITO et al., 2008).

As plântulas do porta-enxerto foram transplantadas para vasos plásticos contendo 400 mL de substrato a base de casca de *Pinus* sp. carbonizada autoclavado. Utilizando uma lâmina descartável, flambada, cortou-se o meristema apical do porta-enxerto Shelper, logo acima das folhas cotiledonares. Em seguida, realizou-se um outro corte longitudinal no caule remanescente, no sentido descendente, em uma profundidade aproximada de 1,0 cm, perpendicular às folhas cotiledonares.

Para o preparo das plântulas empregadas como enxerto, adotou-se o seguinte procedimento: utilizando lâmina descartável, desinfestada, cortou-se as plântulas abaixo 1,5 cm das folhas cotiledonares. Na região do caule, abaixo das folhas cotiledonares, procederam-se dois cortes opostos em bisel, de modo a obter uma porção terminal em forma de cunha de aproximadamente 1,0 cm. Em seguida, encaixou-se a porção cuneiforme do enxerto na fenda do porta-enxerto e foram presos por um clips especial para enxertia. Para aumentar o índice de pegamento, o corte em forma de cunha no enxerto foi executado perpendicular as folhas cotiledonares para que no momento da junção do enxerto e porta-enxerto as folhas cotiledonares das duas plantas ficassem em um ângulo de 90° (CAÑIZARES; GOTO, 2002). Logo após a enxertia, as plantas foram colocadas em uma câmara pós-enxertia, com umidade de 90 % e temperatura de 28 °C, onde permaneceram por um período de dez dias (Figura 1). Após esse período, as plantas foram transferidas para casa-de-vegetação, onde permaneceram durante todo o ensaio experimental.



**Figura 1.** Plantas de pepino partenocárpico híbrido ‘Hokushin’ enxertadas em abóbora Shelper em câmara úmida pós-enxertia.

### 2.1.3. Inoculação

Decorridos 10 dias da retirada das plantas da câmara pós-enxertia foi realizada a inoculação do patógeno, utilizando-se o método do palito modificado (VERZIGNASSI et al., 2004).

Para tanto, discos de 0,5 cm de diâmetro de meio de cultivo BDA contendo micélio de *D. bryoniae* foram retirados das colônias com 7 e 12 dias de idade e meio palito de dente esterilizado, contendo o referido disco na ponta, foi inserido no caule de cada planta, seguido de 24 h de incubação em câmara úmida (Figura 2).



**Figura 2.** A) Planta inoculada acima do ponto de enxertia; B) Inoculação no ponto de enxertia; C) Planta inoculada abaixo do ponto de enxertia.

#### 2.1.4. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis repetições, sendo cada repetição, constituída de um vaso, contendo uma planta. Os tratamentos utilizados foram:

Tratamento 1 – Plantas do híbrido de pepino partenocárpico enxertadas em abóbora Shelper e inoculadas no hipocótilo do enxerto;

Tratamento 2 – Plantas do híbrido de pepino partenocárpico enxertadas em abóbora Shelper e inoculadas na região de união enxerto/porta-enxerto;

Tratamento 3 – Plantas do híbrido de pepino partenocárpico enxertadas em abóbora Shelper e inoculadas no hipocótilo do porta-enxerto;

Tratamento 4 – Plantas do híbrido de pepino partenocárpico, enxertadas em abóbora Shelper;

Tratamento 5 – Plantas do híbrido ‘Hokushin’, em pé-franco, inoculadas no hipocótilo;

Tratamento 6 – Plantas de abóbora Shelper, em pé-franco, inoculadas no hipocótilo.

### 2.1.5. Avaliações e análise dos resultados

As avaliações foram iniciadas dois dias após a inoculação e, a partir de então, foram efetuadas a cada quatro dias. Quantificaram-se os sintomas medindo-se o comprimento longitudinal e o perpendicular a ele da necrose provocada pela inoculação do patógeno. A intensidade de doença correspondeu à multiplicação das duas dimensões dividido por dois, constituindo a área média da lesão em centímetros quadrados.

Após as avaliações, os dados de área média de lesão de podridão gomosa foram dispostos em curvas temporais de progresso. Por meio das avaliações da curva de progresso foi possível estimar a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para cada tratamento estudado, através do Programa AACPD. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade (FERREIRA, 2003).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Efeito da enxertia de plantas de pepino partenocárpico em plantas de abóbora Shelper no controle do crestamento gomoso em casa-de-vegetação

O nível de compatibilidade entre porta-enxerto e enxerto foi de 98%. Este valor foi próximo ao obtido por Ito et al. (2008), que obteve um nível de pegamento de 100% utilizando como enxerto o híbrido Bonus II e o porta-enxerto abóbora Shelper.

Os resultados mostram que houve efeito da enxertia na severidade da doença no híbrido de pepino partenocárpico 'Hokushin'.

Os resultados mostraram a eficiência da enxertia em abóbora Shelper, na redução da severidade da doença podridão gomosa no híbrido de pepino partenocárpico 'Hokushin', sendo altamente significativa.

As plantas de abóbora Shelper inoculadas como controle positivo não apresentaram sintomas de crestamento gomoso, como já se esperava, por ser imune a *D. bryoniae*. O mesmo foi observado por Ito (2006) que, estudando as respostas de diferentes porta-enxertos à *Didymella bryoniae*, verificou que os porta-enxertos 'Shelper', 'Kirameki' e 'Ikky' foram os mais indicados para melão rendilhado por terem sido considerados resistentes quando inoculados com o patógeno.

Para as plantas enxertadas que foram inoculadas no porta-enxerto também não foi observado sintomas e sinais do patógeno, este fato, demonstra que técnica de enxertia não afeta a resistência do porta-enxerto abóbora Shelper ao patógeno *D. bryoniae*. Os mesmos resultados foram observados por Gasparotto (2010), em plantas de meloeiro nobre híbrido Sunrise inoculadas abaixo do ponto da enxertia (porta-enxerto) em que não foram evidenciados quaisquer sintomas de *D. bryoniae*.

A maior susceptibilidade a podridão gomosa foi observada nas plantas pé-franco de pepineiro, aos 28 dias da inoculação, com área de lesão de 4,21 cm<sup>2</sup>, sendo significativamente diferente, ao nível de 5% de probabilidade, dos outros tratamentos (Tabela 1). Para as plantas inoculadas no hipocótilo do enxerto e as inoculadas na região enxerto/porta-enxerto, as lesões atingiram área de 3,45 e 2,57 cm<sup>2</sup>, respectivamente.

**Tabela 1.** Severidade de podridão gomosa em plantas de pepino partenocárpico híbrido ‘Hokushin’ enxertadas em abóbora Shelper e em pé-franco e inoculadas em diferentes pontos

Tratamentos <sup>1</sup>	Severidade (cm <sup>2</sup> ) <sup>2</sup>	Redução da área da lesão (%)
<b>1</b>	3,45 c	18,3
<b>2</b>	2,57 b	39,1
<b>3</b>	0 a	100
<b>4</b>	0 a	100
<b>5</b>	4,21d	0
<b>6</b>	0 a	100
<b>C.V.(%)</b>	22,14	

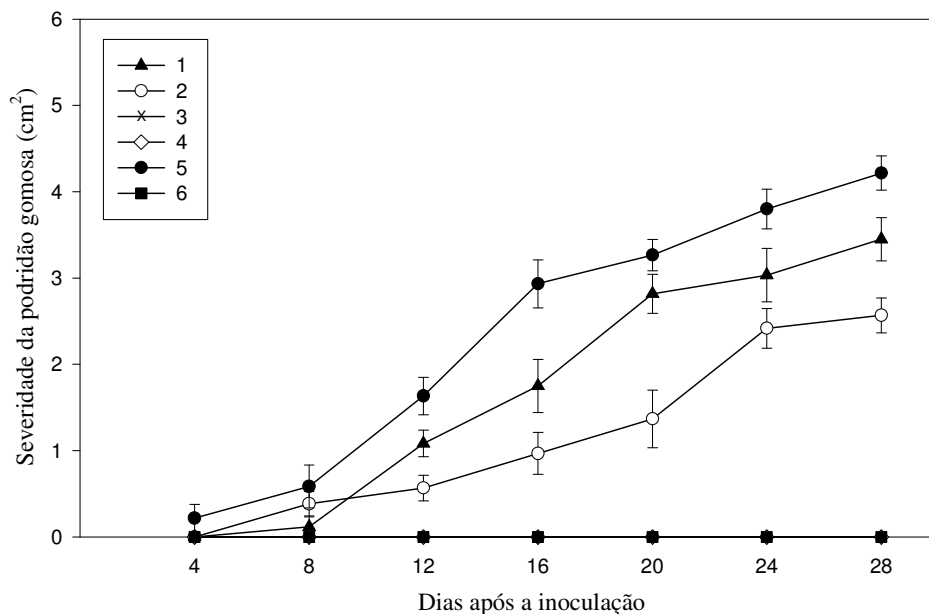
<sup>1</sup>1- Plantas do híbrido de pepino partenocárpico enxertadas em abóbora Shelper e inoculadas no hipocótilo do enxerto; 2 – Plantas do híbrido de pepino partenocárpico enxertadas em abóbora Shelper e inoculadas na região de união enxerto/porta-enxerto; 3 – Plantas do híbrido de pepino partenocárpico enxertadas em abóbora Shelper e inoculadas no hipocótilo do porta-enxerto; 4 – Plantas do híbrido de pepino partenocárpico, enxertadas em abóbora Shelper; 5 – Plantas do híbrido ‘Hokushin’, em pé-franco, inoculadas no hipocótilo; 6 – Plantas de abóbora Shelper, em pé-franco, inoculadas no hipocótilo. <sup>2</sup>Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

A partir do quarto dia da inoculação foi possível distinguir os tratamentos quanto à intensidade da doença. Conforme a Figura 3 observou-se que, as plantas de pepino partenocárpico inoculadas com *D. bryoniae* no hipocótilo (tratamento 5) apresentaram à maior intensidade de doença, até ao final do experimento, seguido das plantas enxertadas e inoculada no hipocótilo do enxerto (tratamento 1). Inicialmente as plantas enxertadas e inoculadas na região de união enxerto/porta-enxerto, apresentaram-se de forma mais rápida e com maior intensidade da doença, em relação às plantas de pepino enxertadas e inoculadas no hipocótilo do enxerto.

No entanto, após o segundo dia de avaliação observou-se uma situação inversa, ou seja, a doença desenvolveu-se mais rapidamente e com maior intensidade nas plantas de pepino enxertadas e inoculadas no hipocótilo do enxerto diferindo das plantas enxertadas e inoculadas no ponto da enxertia em que, o progresso da doença ocorreu de forma mais lenta e com menor intensidade (Figura 3).

Gasparotto (2010), observou que em plantas de meloeiro nobre híbrido Sunrise enxertadas e inoculadas no ponto da enxertia os sintomas só se manifestaram após o oitavo dia da inoculação com o patógeno, de forma mais lenta e com menor intensidade. A mesma autora ressalta que, em plantas enxertadas e inoculadas próximo ao porta-enxerto imune, o patógeno demora mais para causar sintomas nas plantas inoculadas.

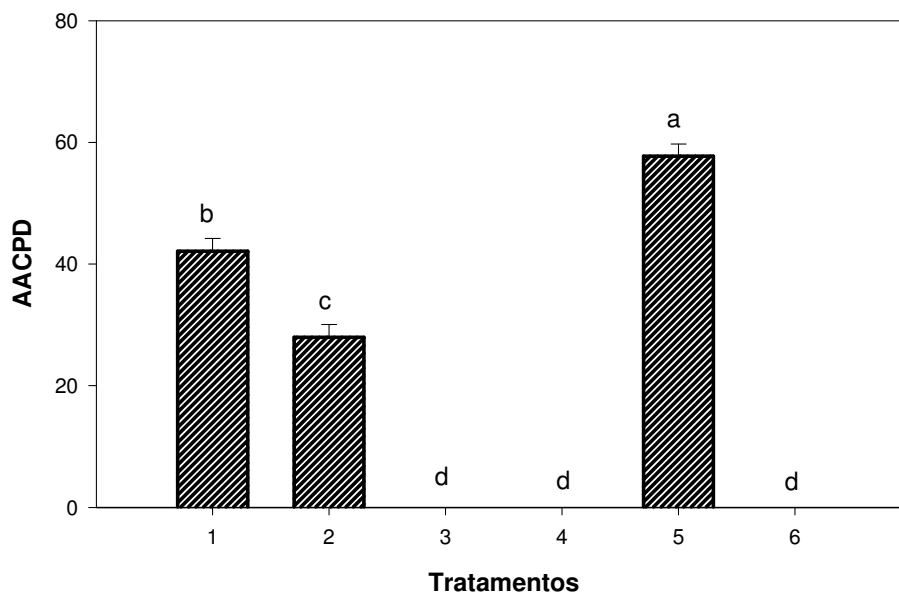




**Figura 3.** Severidade de podridão gomosa em plantas de pepino partenocárpico enxertadas em abóbora Shelper e inoculadas em pontos distintos: 1- Plantas do híbrido de pepino partenocárpico enxertadas e inoculadas no hipocótilo do enxerto; 2 – Plantas do híbrido de pepino partenocárpico enxertadas e inoculadas na região de união enxerto/porta-enxerto; 3 – Plantas do híbrido de pepino partenocárpico enxertadas e inoculadas no hipocótilo do porta-enxerto; 4 – Plantas do híbrido de pepino partenocárpico, enxertadas; 5 – Plantas do híbrido ‘Hokushin’, em pé-franco, inoculadas no hipocótilo; 6 – Plantas de abóbora Shelper, inoculadas no hipocótilo.

Na Figura 4 observa-se a área abaixo da curva de progresso da doença podridão gomosa (AACPD), com diferenças significativas entre plantas do híbrido ‘Hokushin’ enxertadas e em pé-franco inoculadas no hipocótilo, sendo evidenciado o efeito positivo da enxertia em porta-enxerto imune na redução da AACPD da podridão gomosa em plantas de pepino partenocárpico. Maiores valores da AACPD foram obtidos para as plantas pé-franco.

Penharbel et al. (2007) obteve resultados semelhantes avaliando melão nobre híbrido ‘Bônus II’ e pepino partenocárpico híbrido ‘Natsubayash’, enxertados em abóbora Shelper, obtendo maior susceptibilidade a podridão gomosa nas plantas pé-franco de meloeiro e pepineiro, com área de lesão de 632,0 mm<sup>2</sup> e 43,8 mm<sup>2</sup>, respectivamente.



**Figura 4.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em plantas de pepino partenocárpico enxertadas em abóbora Shelper e em pé-franco, inoculadas em diferentes pontos: 1- Plantas de pepino partenocárpico enxertadas e inoculadas no hipocótilo do enxerto; 2 – Plantas do híbrido de pepino partenocárpico enxertadas e inoculadas na região de união enxerto/porta-enxerto; 3 – Plantas do híbrido de pepino partenocárpico enxertadas e inoculadas no hipocótilo do porta-enxerto; 4 – Plantas do híbrido de pepino partenocárpico, enxertadas em abóbora Shelper; 5 – Plantas do híbrido ‘Hokushin’, em pé-franco, inoculadas no hipocótilo; 6 – Plantas de abóbora Shelper, em pé-franco, inoculadas no hipocótilo. Barras acompanhadas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Aguiar (2008), estudando o efeito da enxertia de diferentes híbridos de pepino partenocárpico susceptíveis (‘Hokushin’, Taisho, Samurai, Tsuyataro, Natsubayashi e Soundai) enxertados em plantas de abóbora resistentes a podridão gomosa, observaram menor progresso da doença em plantas enxertadas quando comparadas com as plantas não-enxertadas.

Plantas de meloeiro nobre Bônus II enxertadas no porta-enxerto abóbora ‘Strong Tosa’ inoculados com *D. bryoniae* na região do porta-enxerto, quase não apresentaram lesão após 42 dias da inoculação (SILVA, 2010). O mesmo autor ressalta que, a não expansão da lesão, deve-se à resistência do porta-enxerto ao ataque do fungo, provavelmente pela síntese de novos carboidratos, principalmente calose e celulose, os quais são adicionados ao interior da parede celular. Segundo Matiello et al. (1997), isto ocorre quando o patógeno começa a penetrar na parede celular, com hifas ou haustórios infecciosos. Esta deposição de

carboidratos continua após a penetração do patógeno, até que eles se tomem configurados como uma cúpula ou alongados, sendo denominados de papila (AIST, 1976).

Trionfetti-Nisini et al. (2000) observaram em plantas de meloeiro cv. Proteo enxertadas em abóbora d' água (*Benincasa hispida*), pepino africano (*Cucumis metuliferus*) e abóbora (*Cucumis moschata*) a ocorrência de sintomas de *D. bryoniae* em que as lesões permaneceram confinadas nos porta-enxertos não afetando a planta enxertada.

Bletsos (2005) obteve resultados positivos utilizando-se a enxertia em porta-enxertos resistente à *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* em melão. O mesmo autor ressalta que, as plantas enxertadas apresentaram sintomas mais leves nas folhas e menor incidência de doença em relação ao controle. Além, desse efeito positivo no controle da doença, a enxertia resultou no aumento da produtividade e no crescimento das plantas de melão.

Estudos avaliando o efeito de porta-enxertos de abóbora e melão sobre a produtividade e controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, observaram que mudas de melão susceptível enxertadas em porta-enxerto de melão resistentes apresentaram menor severidade de doença do que as mudas enxertadas em abóbora (COHEN et al., 2002)

A técnica da enxertia tem sido uma alternativa significativa no controle de doenças causadas por patógenos do solo. Desse modo, a utilização da enxertia com porta-enxerto resistente a *D. bryoniae*, mostrou-se eficiente em reduzir significativamente a podridão gomosa em pepino “partenocárpico” híbrido ‘Hokushin’. Aliada a enxertia, a associação de outras técnicas de manejo da podridão gomosa poderá ser utilizada, no controle da doença.

#### 4. CONCLUSÃO

Nas condições deste experimento houve redução da severidade do crestamento gomoso em plantas de pepino partenocárpico, por meio da técnica de enxertia em porta-enxerto imune a *D. bryoniae*, em casa-de-vegetação.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, B. M. **Caracterização molecular, cultural e patogênica de *Didymella bryoniae* de cucurbitáceas**. Maringá: UEM, 62p (Tese Doutorado),2008.
- AIST, J. R. Papillae and related wound plugs of plant cells. **Annual Review of Phytopathology**, St. Paul, v. 14, p. 145-163, 1976.
- BLANCO, F. F.; FOLEGATTI, M. Manejo da água e nutrientes para o pepino em ambiente protegido sob fertirrigação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 6, n. 2, p. 251-255, 2002.
- BLETOSOS, F. A. Use of Grafting and Calcium Cyanamide as Alternatives to Methyl Bromide Soil Fumigation and their Effects on Growth, Yield, Quality and *Fusarium* Wilt Control in Melon. **Journal of Phytopathology**, v. 153, n. 3, p. 155-161, 2005.
- CAÑIZARES, K. A. L. et al. Enxertado, partenocárpico fica mais brilhante. In: FNP CONSULTORIA ; COMÉRCIO. **Agriannual 97**: Anuário estatístico da Agricultura Brasileira, São Paulo, p. 332-33, 1996.
- CAÑIZARES, K. A. L.; GOTO, R. Crescimento e produção de híbridos de pepino em função da enxertia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 16, n. 2, p. 110-113, 1998.
- CAÑIZARES, K. A. L.; GOTO, R. Enxertia em Cucurbitáceas. In: GOTO, R.; SANTOS, H. S.; CAÑIZARES, K. A. L. (Org.). **Enxertia em Hortaliças**. 1. ed. São Paulo: Fundação Editora UNESP, v. 1, p. 55-56, 2003.
- CAÑIZARES, K. A. L.; RODRIGUES, J. D.; GOTO, R. Crescimento e índices de troca gasosa em plantas de pepino irrigadas com água enriquecida com CO<sub>2</sub>. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 4, p. 706-711, 2004.
- CAÑIZARES, K.A.L.; GOTO, R. Comparação de métodos de enxertia em pepino. **Horticultura Brasileira**, v.20, n.1, p.95-99, 2002.
- COHEN, R.; HOREV, C.; BURGER, Y.; SHRIBER, S.; HERSHENHORN, J.; KATAN, J.; EDELSTEIN, M. Horticultural and pathological aspects of *Fusarium* wilt management using grafted melons. **HortScience**, v. 37, n° 7, p. 1069-1073, 2002.
- COSTA, P. C.; CAÑIZARES, K. A. L.; GOTO, R. Produção de pepino de plantas enxertadas cultivadas em soluções nutritivas com diferentes teores de potássio. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 3, p. 207-209, 2001.
- FERREIRA, D. F. **Sisvar**: Sistema para análise de variância para dados balanceados versão 4.2. Lavras: UFLA, 2003.
- FUJIEDA, K. Cucumber. In: KONISHI, K.; IWAHORI, S.; KITAGAWA, H.; YAKUWA, T. **Horticulture in Japan**. Asakura Publishing Co., Ltda, Tokyo, 1986. 180 p.

GASPAROTTO, F. **Transmissão e controle de *Didymella bryoniae* em meloeiro nobre.** Maringá, 2010. 169p. Tese (doutorado). Universidade Estadual de Maringá.

ITO, L.A.; BRAZ, L.T.; CASTOLDI, R.; CHARLO, H.C.O. Response of Rootstocks to stem canker and the production e quality of melon under protected cultivation. **Acta Horticulturae**, v. 771, p.151-155, 2008.

ITO, L. A. **Metodologia de inoculação, resposta de porta-enxertos ao cancro da haste, compatibilidade da enxertia e efeitos na produção do melão ‘Bônus n 2’.** 2006. 43 p. (Monografia de graduação em Agronomia), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

KAWAIDE, T. Utilization of rootstocks in cucurbits production in Japan. **Japanese Agricultural Research Quaterly**, v.18, n.4, p.285-288, 1985.

LIMA, M. S. et al. Avaliação de porta-enxertos para pepino tipo partenocárpico. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 1, p. 169-172, 2000.

MATIELLO, R. R.; BARBIERI, R. L.; CARVALHO, F. I. F. Resistência das plantas a moléstias fúngicas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, n.1, p.161-168, 1997.

PEIL, R. M. A enxertia na produção de mudas de hortaliças. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 6, p. 1169-1177, 2003.

PENHARBEL, M. P.; BURIN, D. N.; GASPAROTTO, F.; BONALDO, S. M.; VIDA, J. B. Efeitos da enxertia na reação de híbridos de pepino “partenocárpico” (*Cucumis sativus*) e de híbridos de melão nobre (*Cucumis melo* var. *reticulatus*) à *Didymella bryoniae*, agente causal da podridão gomosa. **Anais do XVI EAIC**, 2007.

RIZZO, A. A. N.; CHAVES, F. C. M.; LAURA, V. A.; GOTO, R. Avaliação de métodos de enxertia e porta-enxertos para melão rendilhado. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n.4, p.808-810, 2004.

SANTOS, H. S.; GOTO, R. Enxertia em hortaliças. In: GOTO, R.; SANTOS, H.S.; CAÑIZARES, K. A. L. (Org.). **Enxertia em Hortaliças**. 1. ed. São Paulo: Fundação Editora UNESP, v.1, 2003. p.9-11.

SANTOS, H. S.; GOTO, R. Enxertia em plantas de pimentão no controle da Murcha de fitófitoro em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.1, p.45-49, 2004.

SILVA, E. S. **Porta-enxertos, concentrações de potássio na resistência à *Didymella bryoniae* e relações fisiológicas do meloeiro.** Botucatu: UNESP; 87p. (Dissertação), 2010.

TRIONFETTI-NISINI, P; BUZI, A; GRANATI, E; CHILOSI, G; CRINO, P; MAGRO, P. Screening for resistance to *Didymella bryoniae* in rootstocks of melon. **Bulletin-OEPP**. 2000; 30(2): 231-234.

VERZIGNASSI, J. R; VIDA, J. B.; GASPAROTTO, F.; CORTEZ, G. L. S.; LORENZETTI, E. R.; FARIA, G. de S.; TESSMANN, D. J.; SEVERINO, J. J. Método do palito para inoculação de *Didymella bryoniae* em melão nobre e pepino "partenocárpico". **Fitopatologia Brasileira**, v.29 (S), p.154, 2004.

VIDA, J.B., TESSMANN, D.J., ZAMBOLIM, L., VERZIGNASSI, J.R.; BRANDÃO FILHO, J.U.T. Controle da podridão gomosa em melão rendilhado em cultivo protegido por sanitização de ferramenta de poda. **Fitopatologia Brasileira**, v.29,n.6, p.626-630. 2004.

## **CAPÍTULO VI**

### **INFECCÃO LATENTE E SISTÊMICA DE *Didymella bryoniae* EM MELOEIRO NOBRE EM AMBIENTE PROTEGIDO**



## RESUMO

O meloeiro nobre (*Cucumis melo* L.) é uma cultura que está sujeita ao ataque de vários microorganismos. Muitos desses patógenos são agentes causais de doenças que podem ser transmitidas por sementes infestadas ou contaminadas. Dentre elas, o crestamento gomoso do caule, podridão gomosa ou cancro da haste, causado por *Didymella bryoniae* (Auersw) Rehm, anamorfo *Ascochyta cucumis* Fautrey ; Roum [= *Phoma cucurbitacearum* (Fr.) Sacc.] é a mais destrutiva doença em meloeiros nobres no Estado do Paraná, podendo causar danos de até 100%. Em função da utilização de grandes volumes de sementes importadas de espécies cultivadas em estufa no Brasil não apresentarem nenhuma garantia de sanidade, é provável que esse fator seja também fonte de variação na incidência da doença entre as estufas. Além da transmissão por sementes, os esporos do fungo podem ser levados por vento ou chuva, fazendo com que ocorra o repasse da doença também para áreas vizinhas, se não houver um controle adequado e antecipado. Assim, este trabalho teve como objetivo constatar as infecções latente e sistêmica de *D. bryoniae* em plantas de meloeiro nobre, com inóculo originário de sementes, utilizando PCR Multiplex com oligonucleotídeos específicos para o patógeno. Foram realizados dois ensaios: 1- Investigação da infecção latente do patógeno através da extração de DNA total na região do caule de plântulas assintomáticas de meloeiro nobre; 2 – Investigação da infecção latente do patógeno através da extração de DNA total em plantas assintomáticas cultivadas em ambiente protegido; 3 – Investigação da infecção sistêmica do patógeno em plantas de meloeiro nobre. Através da PCR Multiplex foi possível constatar no caule de plantas assintomáticas de meloeiro nobre a ocorrência de infecção latente. Em fragmentos assintomáticos do caule a 5, 15 e 30 cm do tecido sintomático de meloeiro nobre foi possível comprovar a infecção sistêmica de *D. bryoniae*.

**Palavras-chaves:** *Didymella bryoniae*. Infecção latente. *Cucumis melo* var. *reticulatus*. Detecção molecular.

## ABSTRACT

The muskmelon (*Cucumis melo* L.) is a culture that is subject to attack by various microorganisms. Many of these pathogens are causative agents of diseases that can be transmitted by infected or infested seed. Among them, Gummy stem blight, rot or gummy stem blight caused by *Didymella bryoniae* (Auersw) Rehm, anamorph *Ascochyta cucumis* Fautrey ; Roum [= *Phoma cucurbitacearum* (Fr.) Sacc.] Is the most destructive disease in melon noble Paraná State, may cause damage of up to 100%. Depending on the use of large volumes of imported seed species grown in greenhouses in Brazil does not make any guarantee of sanity, it is likely that this factor is also a source of variation in disease incidence between the greenhouses. Besides the transmission by seeds, spores of the fungus can be carried by wind or rain, allowing it to also pass the disease to neighboring areas, if there is adequate control and anticipated. Thus, this study aimed to observe the latent and systemic infections of *D. bryoniae* in melon plants noble, with inoculum originating from seeds, using Multiplex PCR with primers specific for the pathogen. Two experiments were conducted: 1 - Investigation of latent infection of the pathogen through the extraction of total DNA in the region stem from asymptomatic melon seedlings noble; 2 - Investigation of latent infection of the pathogen through the extraction of total DNA in asymptomatic plants grown in ambient protected 3 – Investigation of systemic infection of the pathogen in in muskmelon plants. By Multiplex PCR, we determined the stem of asymptomatic plants of melon noble the occurrence of latent infection. In asymptomatic stem fragments at 5, 15 and 30 cm tissue symptomatic melon noble was possible to prove the systemic infection of *D. bryoniae*.

**Keywords:** *Didymella bryoniae*. Latent infection. *Cucumis melo* var. *reticulatus*. Molecular detection.

## 1. INTRODUÇÃO

O meloeiro pertence à família Cucurbitaceae, gênero *Cucumis* e espécie *Cucumis melo* L. é uma olerícola originária da região central da Ásia e também da África. Foi trazido ao Brasil pelos escravos, sendo conhecido desde o século XVI. A segunda introdução foi feita pelos imigrantes europeus, iniciando-se de fato a expansão da cultura, sobretudo no Estado do Rio Grande do Sul, considerado primeiro centro de cultivo no país, depois em São Paulo, Pará e região Nordeste, principalmente nos Estados do Rio Grande do Norte, Ceará, Bahia e Pernambuco (ALVARENGA; RESENDE, 2002; GRANGEIRO et al., 2002).

São produzidos comercialmente os principais melões pertencentes a dois grupos botânicos: *Cucumis melo inodorus* Naud. e *Cucumis melo reticulatus* Naud., que correspondem aos melões inodoros e aos aromáticos, respectivamente (ALVES, 2000). Estes últimos são considerados melões nobres, por possuírem frutos de melhor qualidade, com aroma e sabor característicos (PÁDUA, 2001).

Essa cultura pode ser acometida pela podridão gomosa, doença causada pelo fungo *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm que, no Brasil, tem sido considerada um dos principais problemas para essa cultura (KUROZAWA; PAVAN, 1997). De acordo com Van Steekelenburg (1983), a doença pode limitar o cultivo desta espécie de cucurbitáceas em regiões onde ocorrem períodos de grande umidade.

Em cultivo protegido, a podridão gomosa tem ocorrido com maior intensidade e maior taxa de progresso, quando comparado ao cultivo convencional, condicionada por efeitos diretos do ambiente aéreo e do solo sobre o patógeno e indiretos através de mudanças fisiológicas e anatômicas nas plantas hospedeiras (VIDA et al., 2001; VAN STEEKELENBURG, 1983). Além de efeitos climáticos, pesadas adubações nitrogenadas têm levado plantas de melão, cultivadas em estufas plásticas, a maior predisposição à *D. bryoniae*, onde a doença, não raramente, tem apresentado incidência de 100 %, resultando em danos totais para a cultura (VIDA et al., 1998).

A podridão gomosa tem sido relatada como importante problema sanitário em cultivares de cucurbitáceas, mas poucos foram os trabalhos desenvolvidos sobre essa doença, seu agente causal e suas relações com as espécies hospedeiras. VIDA et al. (2001), por exemplo, relatam a ocorrência de danos da ordem de 1,5 a 100 % em culturas de melão rendilhado conduzidas em estufas plásticas no Estado do Paraná.

Os sintomas variam conforme a idade da planta e a parte afetada. Nas plântulas, o patógeno causa tombamento, assim como manchas circulares nos cotilédones. Em plantas mais desenvolvidas, provoca o cancro das hastes, com fendilhamento longitudinal do córtex e exposição do lenho, às vezes, com exsudação de goma, que resulta na morte do ramo ou da planta inteira, conforme o local da lesão (THINGGAARD, 1987).

*D. bryoniae* pode sobreviver em restos de cultura, na forma de micélio dormente, sendo bastante resistente ao dessecamento. Assim, os resíduos culturais secos e não decompostos podem servir como fonte de inóculo por mais de um ano (VAN STEEKELENBURG, 1983; SHTIENBERG, 2005). Por ser uma doença de disseminação por respingos, o número de focos por área tem grande efeito na taxa de progresso da epidemia (SANTOS, 2005). Outro aspecto importante da doença é o fato do seu agente causal ser naturalmente transmitido pela semente, localizando-se superficialmente ou no seu interior, no perisperma e tecidos cotiledonares (LEE et al., 1984; SUDISHA et al., 2006).

Trabalhos conduzidos por Vida et al. (2002); Gasparoto et al. (2011) evidenciaram que *D. bryoniae* originada de sementes pode apresentar infecção latente em plantas de meloeiro. Além da possível infecção latente de *D. bryoniae*, evidências mostram que a infecção do patógeno nas plantas ocorre de forma sistêmica, com inóculo oriundo das sementes. A partir das sementes, o patógeno se espalha e invade todos os tecidos da planta (GASPAROTTO, 2006).

Devido a ausência de sintomas e a dificuldade de diagnosticar a doença precocemente, tem sido desenvolvido trabalhos utilizando-se da reação em cadeia da polimerase (PCR) e de PCR em tempo real com um conjunto de oligonucleotídeos específicos, na detecção de infecção latente de diversos patógenos associados a plantas cultivadas, como *Phoma valerianellae* em alface (PELLEGRINO et al., 2010), *Xanthomonas albilineans* em cana-de-açúcar (PAN et al., 1997), *Sphaeropsis sapinea* em Pinus (FLOWERS et al., 2003), *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* em oliveira (BERTOLINI et al., 2003), *Puccinia horiana* em crisântemo (PEDLEY, 2009) e *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* em batata (GUDMESTAD et al., 2009).

Assim, este trabalho teve como objetivo constatar as infecções latente e sistêmica de *D. bryoniae* em plantas de meloeiro nobre, com inóculo originário de sementes, utilizando PCR Multiplex com oligonucleotídeos específicos para o patógeno.

## 2. MATERIAL E METÓDOS

### 2.1. Período e localização dos experimentos

O experimento foi realizado entre os meses de fevereiro a junho/2011, na área experimental localizada no Centro Tecnológico de Irrigação (CTI) do Departamento de Agronomia e no laboratório de Biologia Molecular da Universidade Estadual de Maringá (UEM), no município de Maringá, Estado do Paraná.

### 2.2. Aquisição das sementes de melão

Para desenvolvimento do trabalho utilizou-se um lote de sementes de melão nobre do híbrido Bonus II adquiridos em lojas comerciais no município de Maringá, PR.

### 2.3. Produção das plantas de meloeiro nobre

Sementes comerciais do híbrido de meloeiro nobre Bonus II foram pré-germinadas entre papéis umedecidos com água em germinador à temperatura de 28 °C. Quando do início da germinação estas foram semeadas em bandejas de poliestireno de 128 células contendo substrato comercial Plant Max HF. As plantas foram mantidas em condições de casa-de-vegetação semi-climatizada. As irrigações foram realizadas, diariamente, com água de torneira.

Foram realizados três ensaios: 1 – Investigação da infecção latente do patógeno através da extração de DNA total na região do caule de plântulas assintomáticas de meloeiro nobre; 2 – Investigação da infecção latente do patógeno através da extração de DNA total em plantas assintomáticas cultivadas em ambiente protegido; 3 – Investigação da infecção sistêmica do patógeno em plantas de meloeiro nobre.

#### 2.3.1. Investigação da infecção latente a partir do colo assintomático de plântulas de meloeiro nobre

Realizou-se a detecção de infecção latente por PCR Multiplex do DNA extraído do caule de plântulas de meloeiro. Foram utilizadas 40 plântulas de meloeiro nobre do híbrido Bonus II. Realizaram-se sete coletas, a primeira um dia após a emergência das plântulas,

sendo coletadas cinco plantas assintomáticas aleatoriamente. A segunda coleta foi realizada cinco dias após a emergência, coletando-se cinco plantas assintomáticas. A terceira coleta aos quinze dias após emergência. A partir da quarta coleta aos vinte dias após emergência foram realizadas as coletas a cada dez dias até aos 50 dias após a emergência. As plântulas que apresentaram sintomas no decorrer das coletas foram descartadas. Esse procedimento foi adotado para evitar disseminação de inóculo de plantas doentes para plantas saudáveis. Cada plântula foi cortada um pouco acima da raiz e abaixo das folhas definitivas, e teve suas folhas cotiledonares retiradas. O caule foi, então, lavado com água destilada e armazenada em freezer a -20 °C até o momento da extração de DNA. Para extração do DNA total cada planta foi macerada individualmente constituindo uma amostra.

### 2.3.2. Investigação da infecção latente do patógeno através da extração de DNA total em plantas assintomáticas a partir do caule de plantas de meloeiro nobre sob condições de cultivo protegido

Para a determinação da infecção latente e sistêmica por PCR Multiplex, 168 sementes de meloeiro nobre híbrido Bonus II foram semeadas em bandejas de poliestireno de 128 células, contendo substrato comercial Plant Max HF<sup>®</sup>, sendo mantidas em casa-de-vegetação semi-climatizada. Após a emissão da segunda folha definitiva (aproximadamente 25 dias após a emergência) as plântulas foram transplantadas para em vasos contendo areia lavada de construção sob estufa plástica coberta com polietileno de alta densidade (150 µm), sendo cultivadas em sistema de cultivo hidropônico. O espaçamento foi de 30 cm entre plantas e de 1 metro entre linhas.

Na irrigação utilizou-se uma motobomba ligada a um temporizador digital (FDD-60/SBR) que liga e desliga conforme horário programado. Na fase inicial e de maturação de frutos foi utilizado um turno de rega de 15 minutos por dia, aplicando-se uma quantidade de água equivalente a 1 litro de solução nutritiva por vaso por dia. Já na fase de florescimento e frutificação, o turno de rega foi de 30 minutos por dia, que aplicou o equivalente a 2 litros de solução nutritiva por vaso por dia.

As plantas receberam solução nutritiva, através de um sistema de gotejamento pressurizado, diariamente, nos horários de, 9, 12 e 15 horas, por 05 minutos em cada aplicação.

As plantas foram conduzidas de acordo com a metodologia descrita por Brandão Filho e Vasconcellos (1998), com haste única, tutoradas na vertical, com fitilho plástico. Após a instalação da cultura, foram realizadas capinas manuais e também a aplicação dos inseticidas tiametoxam (0,5g i.a./L), imidaclopride (1,2g i.a./L) e dissulfan (1,1g i.a./L) para o controle de pragas. Para pulverização das plantas com inseticidas utilizou-se um pulverizador costal acionado manualmente com bico cônico. A calda foi preparada de acordo com a dose de cada produto e as plantas foram pulverizadas até a máxima cobertura das folhas. Utilizou-se irrigação localizada com o uso de tubos gotejadores.

Realizaram-se coletas de plantas assintomáticas a partir de cinco dias após transplante das mudas com intervalo de cinco dias até trinta dias após o transplante e a partir deste com intervalo de dez dias até setenta dias após transplante. Para a detecção da infecção latente foram utilizadas seis plantas de meloeiro nobre do híbrido Bonus II a cada coleta.

O caule de cada planta foi cortado um pouco acima da raiz e abaixo das folhas definitivas, e teve suas folhas cotiledonares retiradas. Após cortado o segmento do caule, foi, então, lavado com água destilada e armazenado em freezer a -20 °C até o momento da extração de DNA. Cada fragmento vegetal de cada planta foi macerado individualmente para extração de DNA total, constituindo uma amostra.

### 2.3.3. Investigação da infecção sistêmica do patógeno através da extração de DNA total em plantas sintomáticas

Oitenta dias após o transplante, dez plantas do híbrido Bonus II, produzidas em estufa plástica e apresentando visualmente sintomas localizados de podridão gomosa foram coletadas para a análise de infecção sistêmica, através de corte no coleto.

O caule de cada planta foi cortado em quatro fragmentos de 5 cm cada como se segue: 1) tecido sintomático; 2) 5cm acima do tecido sintomático; 3) 15cm acima do tecido sintomático e 4) 30cm acima do tecido sintomático. Cada fragmento vegetal de cada planta foi macerado individualmente para extração de DNA total, constituindo uma amostra.

### 3.1. Avaliações

As avaliações dos sintomas de podridão gomosa nas plantas de meloeiro nobre híbrido Bonus II que, estavam sob condições de cultivo protegido, foram realizadas aos dez

dias após o transplante, sendo efetuadas a cada dez dias até aos 80 dias após o transplante. Avaliou-se a incidência de podridão gomosa na cultura pela contagem do número de plantas com sintomatologia de podridão gomosa em cada planta. A severidade também foi quantificada através da escala de notas proposta por Dusi et al. (1994), variando de 0 a 4 (0=ausência de sintomas visíveis; 1= lesão encharcada na haste da planta até 1cm de diâmetro; 2= lesão encharcada na haste da planta com mais de 1cm de diâmetro; 3= lesão parcialmente necrosada na haste com murcha parcial da planta e 4= necrose da haste com murcha total e morte da planta).

#### 4.1. Extração de DNA total

Para extração do DNA total em todos os experimentos seguiu-se o protocolo descrito por Koenig et al. (1997). O tecido das amostras foi macerado em nitrogênio líquido até obter a consistência de um fino pó. Aproximadamente 300 µL do macerado foram transferidos para microtubos, onde foram adicionados 700 µL de tampão de extração, que consiste na mistura dos tampões de lise nuclear (0,2 M Tris pH 7,5; 0,05 M EDTA e 2% CTAB), tampão de isolamento de DNA (0,2 M Tris pH 7,5; 0,05 M EDTA e 0,35 M sorbitol) e sarkosil 5%, nas proporções de 1:1:0,4, respectivamente. Os tubos foram homogeneizados em vórtex e incubados a 65 °C por 60 minutos em banho-maria. Foi realizada a extração com solvente orgânico, adicionando-se 500 µL da mistura clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção de 24:1, em cada microtubo. Após a centrifugação das amostras a 12.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para microtubos, adicionados de 5 µL de uma suspensão contendo 20 mg/mL de RNase e incubados em banho-maria por 30 minutos a 37 °C. Em seguida, foi adicionado, em cada tubo, 5 µL de uma suspensão contendo 20mg/mL de proteinase K e incubados por 20 minutos a 37 °C. A precipitação do DNA foi feita com isopropanol na proporção 2/3 da solução aquosa em cada amostra. Após centrifugação, de 5 minutos a 10.000 rpm, o DNA foi lavado com etanol 70 % por três vezes. O etanol foi descartado e os tubos invertidos, abertos sob papel absorvente esterilizado por 10 a 15 minutos até o etanol evaporar. O DNA foi ressuscitado adicionando-se 100 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1 mM EDTA) e as amostras foram mantidas a 4 °C.

As amostras de DNA foram tratadas com cloreto de lítio (LiCl) para melhorar sua qualidade. Este procedimento foi realizado adicionando-se 300 µL de LiCl 4M, mantido em gelo, em cada amostra. Em seguida, o material foi incubado a 4°C, por 30 minutos. Após a



incubação, centrifugou-se as amostras a 12000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo contendo 600 µL de isopropanol. As amostras foram agitadas gentilmente, mantidas em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente e, após, foram novamente centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante, o DNA foi lavado com 100 µL de etanol 70 % gelado, e centrifugou-se a 12000 rpm por 5 minutos. O etanol foi descartado e os tubos invertidos, abertos sob papel absorvente esterilizado por 10 a 15 minutos até o etanol evaporar. O DNA foi ressuspendido, adicionando-se 100 µL de tampão TE (10mM Tris-HCl Ph 7,5; 0,1 mM EDTA) e as amostras foram mantidas a 4 °C.

### 5.1. Reação de PCR Multiplex

O DNA total extraído de cada amostra de planta foi utilizado em reações múltiplas de PCR, utilizando-se o DNA original ou diluído em água em proporções variáveis. Como controle negativo foi utilizado o mix de reação de PCR sem adição de amostra de DNA. Como controle positivo foi utilizada amostra de DNA extraído de isolados de *Didymella bryoniae*, obtidos a partir de plantas de meloeiro nobre com sintomatologia de podridão gomosa. Para as reações foram empregados os oligonucleotídeos específicos D7S (5'-CTACAATTGCGGGCTTTGC), D6 (5' CGCCGATTGGACAAAACCTTAAA) e UNLO28S22 (5' GTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATG), em reação múltipla (KOCH; UTKHEDE, 2004). Estes oligonucleotídeos amplificam fragmentos genômicos de 535 pb (UNLO28S22 + D7S) e 461 pb (UNLO28S22 + D6) na presença de DNA de *Didymella bryoniae*. As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador Tpersonal Whatman Biometra, em microtubos contendo 25 µL da mistura de reação constituída por 50 mM de KCl; 10 mM de Tris; pH 7,5; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,5 unidades de Taq DNA polimerase; 0,2 mM de cada dNTP; 15 µmol de cada oligonucleotídeos e 40 ng de DNA de cada amostra. A reação de PCR foi baseada em 31 ciclos, sendo: 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 63 °C, e 45 segundos a 72 °C. Previamente aos ciclos, as amostras foram submetidas à temperatura de 94 °C por 1 minuto e de um período extra de extensão de 10 minutos à 72 °C, após os 31 ciclos.

Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 2 %, contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) e submerso em tampão TBE. A

separação eletroforética foi de aproximadamente 40 minutos, a 80 volts. Ao término da corrida, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Investigação do período de latência de podridão gomosa em meloeiro nobre

O período de latência do patógeno, avaliado pelo início do aparecimento dos primeiros sintomas de podridão gomosa visíveis em plantas de meloeiro nobre, foi de 32 dias para a primeira planta e de 50 dias após a emergência para a última planta. Estes resultados evidenciam, mais uma vez, a ocorrência de latência do patógeno *D. bryoniae* em meloeiro nobre com inóculo oriundo de sementes. Resultados semelhantes foram obtidos por Gasparotto (2010) que investigando o período de latência de podridão gomosa em meloeiro nobre híbrido Sunrise observou o início dos primeiros sintomas aos 29 dias para a primeira planta e de 68 dias após a emergência para a última planta.

Em plântulas evidenciou-se no caule, abaixo das folhas cotiledonares a ocorrência de lesões aquosas, que posteriormente, tornaram-se necróticas, com coloração palha clara. As lesões cresciam longitudinalmente e transversalmente, e em muitas plântulas ocorria o fendilhamento do caule. Foi possível, visualmente, a observação de picnídios de coloração negra (forma anamórfica, *Ascochyta* sp.), confirmados através da observação das estruturas em microscópio óptico.

#### 3.2. Infecção Latente

##### 3.2.1. Investigação da infecção latente a partir do colo assintomático de plântulas de meloeiro nobre

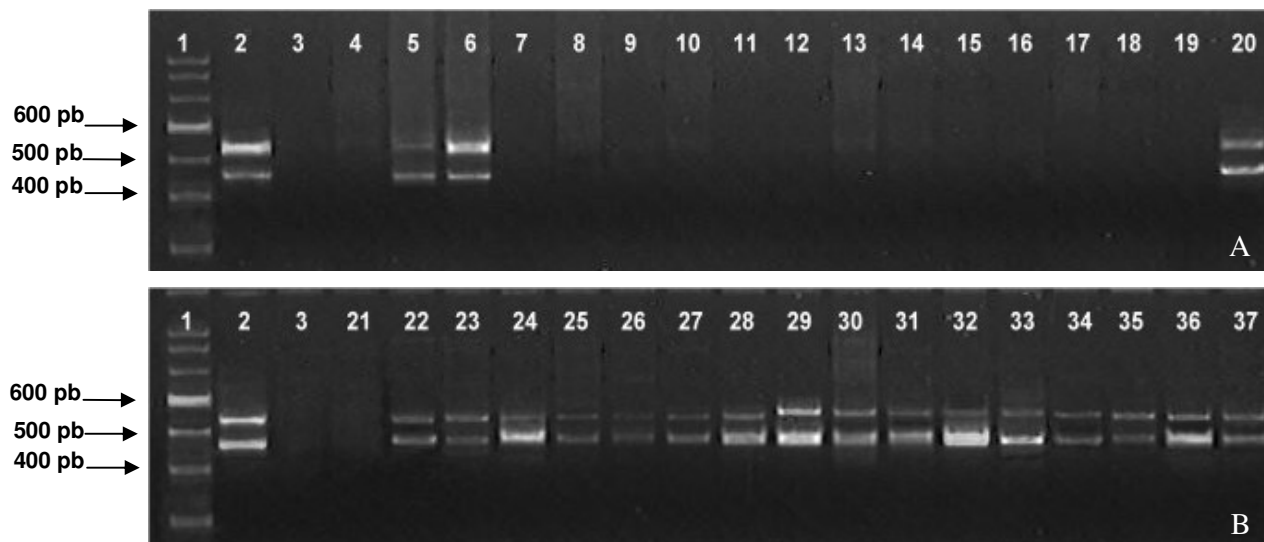
Das 40 amostras três amostras apareceram doença aos 32 dias após emergência e aos 50 dias após emergência duas plântulas foram descartadas, pois, apresentavam sintomas de *D. bryoniae*. E das 35 amostras de plântulas de meloeiro nobre assintomáticas coletadas 20 foram positivo para *D. bryoniae*, representando 57% de associação entre o patógeno e as plântulas de meloeiro nobre (Tabela 1).

**Tabela 1.** Infecção latente de *Didymella bryoniae* em plântulas de meloeiro nobre assintomáticas do híbrido Bonus II detectada por PCR Multiplex, a partir do DNA total extraído do caule

Dias após a emergência	Plantas com <i>D. bryoniae</i> em infecção latente/Número de plantas coletadas
1	2/5
5	0/5
15	0/5
20	3/5
30	5/5
40	5/5
50	5/5
<b>Total</b>	<b>20/35</b>

Segundo Gasparotto (2006), mudas com infecção latente transplantadas, dentro de 15 dias pós-transplante, manifestam sintomatologia de podridão gomosa. Ainda segundo a autora, analisando sementes de meloeiros nobres cultivados no Brasil, dependendo do híbrido, a porcentagem de transmissão, com possível ocorrência de infecção latente, pode chegar a 59 %.

Na primeira avaliação (1 dia após emergência), coletaram - se 5 plântulas de meloeiro nobre sem quaisquer sintomas ou sinais de patógeno, e através do PCR Multiplex com oligonucleotídeos específicos, a partir de caule assintomático, foi possível constatar duas amostras positivas para presença de *D. bryoniae*. Aos cinco e quinze dias após emergência nenhuma resposta positiva para presença de *D. bryoniae* foi obtida. Na quarta avaliação (20 dias após emergência) detectou-se o patógeno em três amostras de DNA total de caule das cinco coletadas. Para 30, 40 e 50 dias após emergência o patógeno foi constatado em todas as cinco amostras de DNA total do caule de plântulas de meloeiro coletadas em cada período (Figura 1).



**Figura 1.** Gel de eletroforese apresentando especificidade na reação múltipla para *Didymella bryoniae* em amostras de DNA total. A) Híbrido Bonus II: 1 – 100 pb Ladder; 2 – controle positivo; 3 – controle negativo; A) - 4 a 8. Plantas assintomáticas coletadas 1 dias após emergência (DAE); 9 a 13. Plantas assintomáticas coletadas 5 DAE; 14 a 18. Plantas assintomáticas coletadas 15 DAE; 19 a 23. Plantas assintomáticas coletadas 20 DAE; B) - 24 a 28. Plantas assintomáticas coletadas 30 DAE; 29 a 33 Plantas assintomáticas coletadas 40 DAE; 34 a 37 Plantas assintomáticas coletadas 50 DAE.

### 3.2.2. Investigação da infecção latente do patógeno a partir do colo assintomático de plantas de meloeiro nobre em cultivo protegido

Através de PCR Multiplex, a partir das amostras individuais de DNA total extraído do caule das plantas assintomáticas de meloeiro nobre, foi possível detectar o patógeno *D. bryoniae* associado a duas plantas das seis coletadas cinco dias após o transplante para estufa; aos 10 dias após transplante das seis plantas coletadas duas foram positivas para *D. bryoniae*, aos 15 dias após transplantes três das seis amostras deram positivo, aos 20, 25, 30, 40, 50, 60 e 70 dias após transplantes, foram positivas para a presença de *D. bryoniae* três, duas, quatro, cinco, três, dois e quatro, respectivamente, das seis plantas coletadas em cada período (Tabela 2). Para as amostras positivas houve a amplificação dos fragmentos genômicos de 535 pb e 461 pb, que são específicos para *D. bryoniae*.

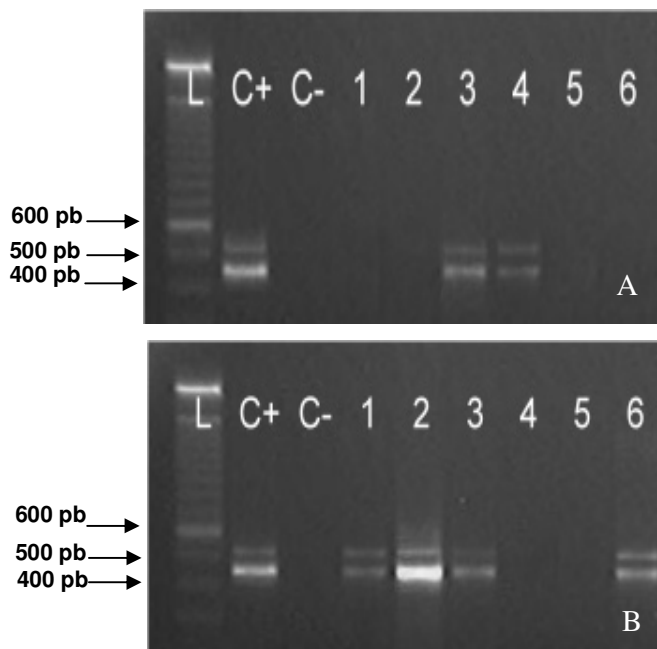
**Tabela 2.** Infecção latente de *Didymella bryoniae* em plantas de meloeiro nobre assintomáticas do híbrido Bonus II detectada por PCR Multiplex, a partir do DNA total extraído do caule

Dias após transplante	Plantas com <i>D. bryoniae</i> em infecção latente/Número de plantas coletadas
5	2/6
10	2/6
15	3/6
20	3/6
25	2/6
30	4/6
40	5/6
50	3/6
60	2/6
70	4/6
<b>Total</b>	<b>30/60</b>

Das 60 amostras analisadas 30 apresentaram respostas positivas para a presença de *D. bryoniae*, representando uma associação de 50% entre o patógeno *D. bryoniae* e as plantas de meloeiro nobre em cultivo protegido. Resultados semelhantes foram obtidos por Gasparotto (2010), que observou reações positivas para presença de *D. bryoniae* em plântulas de melão nobre de 48%.

Assim, a infecção latente corresponde ao estado em que um hospedeiro está infectado por um patógeno, mas não apresenta quaisquer sintomas e sinais (AGRIOS, 2005). Este corresponde ao estado das plântulas de meloeiro nobre nos ensaios. Desde o primeiro dia após a emergência, algumas plântulas já estavam infectadas pelo patógeno *D. bryoniae*, mas não apresentavam quaisquer sintomas de podridão gomosa. Assim, o patógeno apresentou infecção latente em plântulas de meloeiro nobre a partir de inóculo oriundo de sementes.

Os resultados obtidos mostraram que no DNA total extraído do caule das plantas assintomáticas do híbrido Bonus II, havia a presença do patógeno *D. bryoniae*, pois ocorreu a amplificação das regiões do DNA que distinguem *D. bryoniae* de outras espécies similares e de outros microorganismos comuns. Na Figura 2 observa-se reações positivas com amplificação de dois fragmentos genômicos de 535 pb (UNLO28S22 + D7S) e 461 pb (UNLO28S22 + D6), confirmando a presença de *D. bryoniae* em plantas assintomáticas coletadas aos 5 dias e 70 dias após o transplante para ambiente protegido.



**Figura 2.** Gel de eletroforese apresentando especificidade na reação múltipla para *Didymella bryoniae* em amostras de DNA total. A) Híbrido Bonus II: 1 a 6 – Amostras de plantas assintomáticas coletadas 5 dias após o transplante para ambiente protegido. B) 1 a 6 – Amostras de plantas assintomáticas coletadas 70 dias após o transplante.

Neste contexto Windham e King (1983) dizem que a infecção latente em plântulas, sem comprometimento da germinação ou emergência, necessita de condições de estresse para que o fungo se torne patogênico; em plantas já adultas, o fator estressante, responsável pelo desencadeamento dos sintomas, geralmente é atribuído ao enfraquecimento dos tecidos por ocasião da senescência.

### 3.3. Infecção Sistêmica

#### 3.3.1. Investigação da infecção sistêmica do patógeno através da extração de DNA total em plantas sintomáticas

Para constatação do patógeno em infecção sistêmica nas plantas de meloeiro nobre os resultados obtidos mostram que o DNA total extraído do caule das dez plantas sintomáticas analisadas inicialmente, havia a presença do patógeno *D. bryoniae*, pois ocorreu a amplificação das regiões do DNA total para a presença de *D. bryoniae*, através de PCR Multiplex com oligonucleotídeos específicos (Tabela 3).

**Tabela 3.** Detecção de infecção sistêmica de *Didymella bryoniae* em plantas de meloeiro nobre híbrido Bonus II por PCR Multiplex com DNA total extraído de fragmentos de diferentes localizações do caule

Localização do fragmento da planta	Número de plantas Positivas/Coletadas
Tecido sintomático	10/10
5 cm acima do tecido sintomático	9/10
15 cm acima do tecido sintomático	5/10
30 cm acima do tecido sintomático	5/10

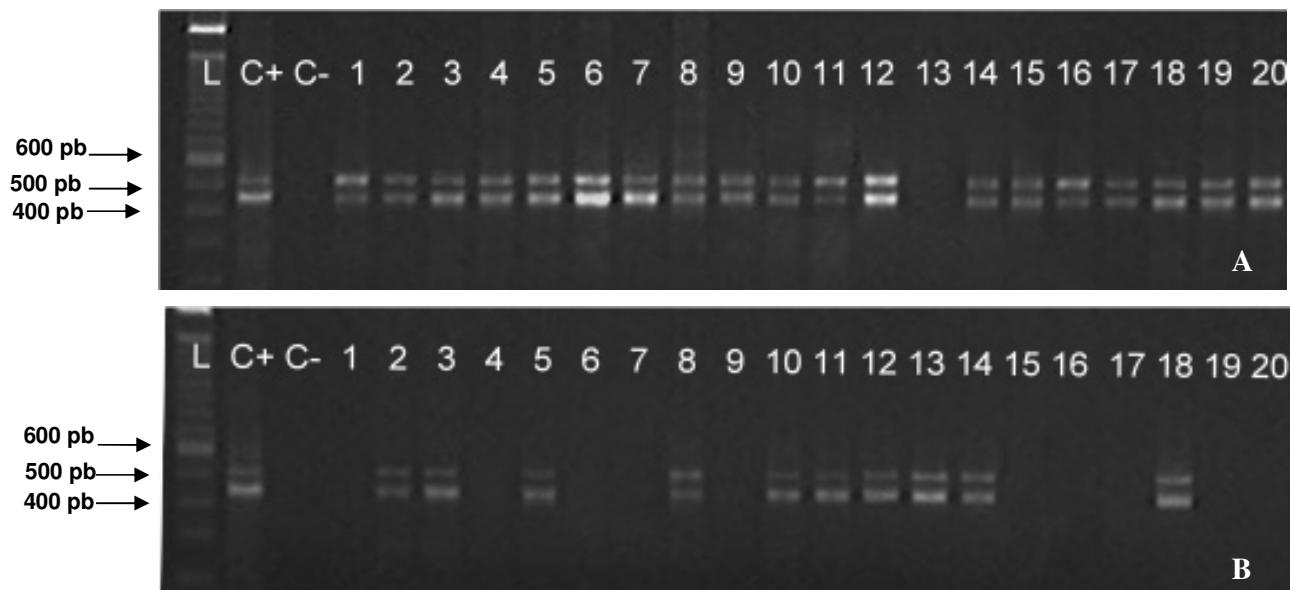
Nas amostras coletadas de fragmentos de caule assintomáticos localizados aos 5 e 15 cm acima da região assintomática, foram obtidas 9 e 5 amostras positivas para a presença de *D. bryoniae*, respectivamente. Nas amostras coletadas de regiões assintomáticas localizadas a 30 cm acima da região sintomática, foi constatada a presença do patógeno em apenas cinco das dez plantas analisadas (Figura 3).

Tem-se como infecção sistêmica a disseminação do patógeno de um ponto internamente para todo o corpo da planta (AGRIOS, 2005). Neste trabalho, foi comprovado a infecção sistêmica de *D. bryoniae* a partir de fragmentos de tecidos coletados a diferentes distâncias do tecido sintomático, por meio da PCR Multiplex com oligonucleotídeos ‘primers’ específicos.

Gasparotto (2010) também constataram para meloeiro nobre a ocorrência de infecção sistêmica de *D. bryoniae*, a partir de 5, 15 e 30 cm acima do tecido sintomático do caule. A mesma autora evidenciou também em meloeiro nobre híbrido Sunrise que *D. bryoniae* pode infectar sementes via sistêmica com inoculação em flores ou caule de plantas.

Casa et al. (1998) relatam a possibilidade da transmissão sistêmica de *Fusarium moniliforme* pelas sementes, tendo como consequência a posterior podridão da espiga e havendo, neste caso, além da perda de rendimento, problemas associados com a presença de micotoxinas nos grãos.





**Figura 3.** Gel de eletroforese apresentando especificidade na reação múltipla para *Didymella bryoniae*. 1 – 100 pb ladder; C<sup>+</sup> – Isolado de *Didymella bryoniae* (controle positivo); C<sup>-</sup> – controle negativo; A) 1 a 10 – Planta com tecido sintomático; 11 a 20 – 5cm acima do tecido sintomático; B) 1 a 10 - 15 cm acima do tecido sintomático; 11 a 20 – 30 cm acima do tecido sintomático.

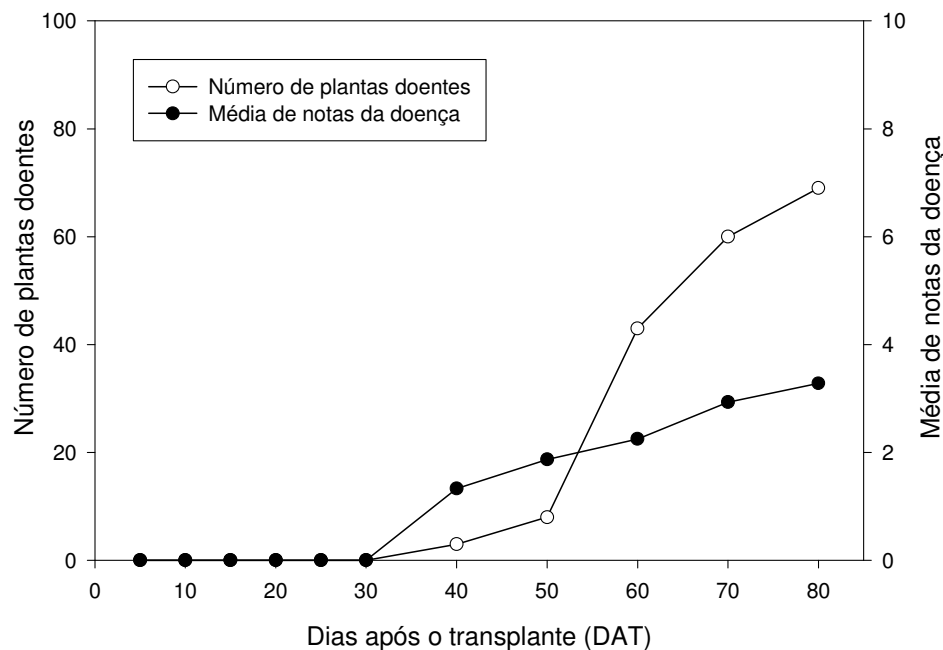
Ao final do experimento avaliou-se a incidência e severidade da podridão gomosa das plantas que estavam sob condições de cultivo protegido

Os primeiros sintomas de podridão gomosa foram observados a partir dos 30 dias após o transplante da mudas de meloeiro nobre híbrido Bonus II, para cultivo protegido. A partir deste período a incidência de podridão gomosa progrediu acentuadamente à medida que as plantas se aproximaram da maturação.

O início dos primeiros sintomas foi observado quando as folhas cotiledonares começaram a senescer e as lesões aquosas se desenvolviam na região do caule abaixo das folhas cotiledonares, apresentando-se de coloração palha clara e tornando-se necróticas. Os sintomas manifestavam-se longitudinalmente e transversalmente, ocorrendo o fendilhamento do caule, observações semelhantes foram obtidas por Gasparotto et al. (2009). Também foi constatada a presença de goma sobre as lesões, sendo um sintoma característico da doença (BRANDÃO FILHO; VASCONCELOS, 1998). Nos tecidos com sintomas mais velhos, ocorreu a formação de numeros corpos de frutificação negros.

Aos 80 dias após o transplante, a incidência de podridão gomosa correspondeu a 41% do total de plantas sob condições de cultivo protegido. A severidade da podridão gomosa

aos 80 dias após o transplante atingiu média de 3,3 pela escala de Dusi et al. (1994), estando entre a nota 3, que correspondeu a lesões parcialmente necrosadas na haste com murcha parcial da planta e a nota 4 que abrangeu as plantas que apresentaram necrose da haste com murcha total e morte das plantas (Figura 4).



**Figura 4.** Incidência e severidade da podridão gomosa em plantas de meloeiro nobre em cultivo protegido.

Valores mais altos que o obtido neste trabalho para a intensidade da podridão gomosa foram observados para plantas de meloeiro nobre, aos 93 dias após o transplante, variando 40,5 a 65,3% (GASPAROTTO, 2010).

A constatação da ocorrência de infecção latente e sistêmica de *D. bryoniae* em melão nobre híbrido Bonus II a partir de inóculo originário de sementes, fica evidente o cuidado que se deve ter de se utilizar sementes saudáveis, para a consequente produção de mudas saudáveis. Além da importância que se deve ter com a qualidade sanitária das sementes, deve-se dar atenção a realização dos tratamentos culturais desde o início do cultivo.

#### 4. CONCLUSÃO

Através da PCR Multiplex foi possível detectar a infecção latente e sistêmica de *D. bryoniae*.

Plântulas de meloeiro nobre apresenta infecção latente de *D. bryoniae* e o patógeno se desenvolve sistemicamente nas plantas.

## REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**, 5th edition. Elsevier Academic Press, 2005, 922p.
- ALVARENGA, M. C. A.; RESENDE, G. M. **A cultura do melão**. Lavras: Editora UFLA, 2002. 149 p.
- ALVES, R. E. (Org.). **Melão: pós-colheita**. Brasília, DF: EMBRAPA, 2000. 43p. (Frutas do Brasil, 10).
- BERTOLINI, E.; OLMOS, A.; LÓPEZ, M. M.; CAMBRA, M. Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive trees. **Phytopathology**, v.93, p.286-292, 2003.
- BRANDÃO FILHO, J. U. T.; VASCONCELLOS, M. A. S. A cultura do meloeiro. In: **Produção de hortaliças em ambiente protegido: condições subtropicais**. Gotto, R.; Tivelli, S.W. (Eds.). Botucatu: Editora Unesp. 1998. p. 161-193.
- CASA, R.T., REIS, E.M. ; ZAMBOLIM, L. Fungos associados à semente de milho produzida nas regiões sul e sudeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira** v. 23, p:370-373.1998.
- DUSI, A.N. TASAKI, S. VIEIRA, J.V. Metodologia para avaliação de resistência a *Didymella bryoniae* em melão. **Horticultura Brasileira, Brasília**, v. 12, n. 1, p. 43-4, 1994.
- FLOWERS, J.; HARTMAN, J.; VAILLANCOURT, L. Detection of latent *Sphaeropsis sapinea* infections in Austrian pine tissues using nested polymerase chain reaction. **Phytopathology**, v.93, p.1471-1477, 2003.
- GASPAROTTO, F. **Avaliação da sanidade de sementes de híbridos de meloeiro nobre indicados para cultivo protegido**. 2006. 42 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá
- GASPAROTTO, F. **Transmissão e controle de *Didymella bryoniae* em meloeiro nobre**. Maringá, 2010. 169p. Tese (doutorado). Universidade Estadual de Maringá.
- GASPAROTTO, F.; VIDA, J. B.; TESSMANN, D. J.; ALVES, T. C. A. Infecção latente de *Didymella bryoniae* em meloeiro nobre. **Summa Phytopathologica**, v.37, n. 1, 2011.
- GASPAROTTO, F.; VIDA, J. B.; TESSMANN, D. J.; BONALDO, S. M.; AGUIAR, R. L.; PENHARBEL, M. P. Eficiência de métodos para de *Didymella bryoniae* associado a sementes de híbridos de meloeiros nobres. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.31, n.3, p.397-402,2009.
- GRANGEIRO, L. C.et al. **Cultivo de melão amarelo**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2002. 30p. (Boletim Técnico).

- GUDMESTAD, N.C.; MALLIK, I.; PASCHE, J.S.; ANDERSON, N.R.; KINZER, K. A real-time PCR assay for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* based on the cellulose A gene sequence. **Plant Disease**, v.93, p.649-659, 2009.
- KOCH, C. A.; UTKHEDE, R. S. Development of a Multiplex classical Polymerase chain reaction technique for detection of *Didymella bryoniae* in infected cucumber tissues and greenhouse air samples. **Canadian Journal Plant Pathology**, v. 26, p. 291-298, 2004.
- KOENIG, R. L.; PLOETZ, R. C.; KISTLER, H. C. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* consists of a small number of divergent and globally distributed clonal lineages. **Phytopathology**, St. Paul, v.87, n.9, p.915-923, 1997.
- KUROZAWA, C. ; PAVAN. M.A. Doenças das cucurbitáceas. In: Amorim, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A. ; Rezende, J.A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**, 2, 3ed. São Paulo: Ceres, p.325-337, 1997.
- LEE, H., MATHUR, S.B. ; NEERGAARD, P. Detection and location of seed-borne inoculum of *Didymella bryoniae* and its transmission in seedlings of cucumber and pumpkin. **Phytopathologische Zeitschrift**, v. 109, p.301-308, 1984.
- PÁDUA, J.G. **Cultivo protegido de melão rendilhado, em duas épocas de plantio**. 2001. 108f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- PAN, Y.B.; GRISHAM, M.P.; BURNER, D.M. A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald disease. **Plant Disease**, v.81, p.189-194, 1997.
- PEDLEY, K.F. PCR-based assays for the detection of *Puccinia horiana* on *chrysanthemums*. **Plant Disease**, v.93, p.1252-1258, 2009.
- PELLEGRINO, C.; GILARDI, G.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. Detection of *Phoma valerianellae* in lamb's lettuce seeds. **Phytoparasitica**, v. 38, p. 159–165, 2010.
- SANTOS, G. R. **Biologia, epidemiologia e manejo do crestamento gomoso do caule da melancia, causado por *Didymella bryoniae***. Brasília: UNB, 232p. (Tese doutorado), 2005.
- SHTIENBERG, D.; GAMLIEL-ATINSKY, E.; RETIG, B.; BRENER, S.; DINOOR, A. Significance of preventing primary infections by *Didymella rabiei* and development of a model to estimate the maturity of pseudothecia. **Plant Disease**, v.89, p.1027-1034, 2005.
- SUDISHA, J.; NIRANJANA, S. R.; UMESHA, S.; PRAKASH, H. S.; SHEKAR SHETTY, H. Transmission of seed-borne infection of muskmelon by *Didymella bryoniae* and effect of seed treatments on disease incidence and fruit yield. **Biological Control**, v.37, n.1, p.196-205, 2006.
- VAN STEEKELENBURG, N.A.M. Epidemiological aspects of *Didymella bryoniae*, the cause of stem and fruit rot of cucumber. Netherlands **Journal of Plant Pathology**, v. 89, p.75-86, 1983.

VIDA, J. B.; TESSMANN, D. J.; BRANDÃO FILHO, J. U. T.; C, NUNES W. M. Provável transmissão de *Didymella bryoniae* por sementes de melão rendilhado em cultivo protegido. **In: Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes**, 7., 2002, Sete Lagoas. Resumos e Palestras. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. p.79.

THINGGAARD, K. Attack of *Didymella bryoniae* on Roots of Cucumber. **Journal Phytopathology**, v.120, p.372-375. 1987.

VIDA, J.B., ZAMBOLIM, L., COSTA, H. ; VALE, F.X.R. Manejo de doenças me cultivos protegidos. In: Zambolim, L. (Ed.) **Manejo integrado, fitossanidade, cultivo protegido, pivô central e plantio direto**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora Ltda., p.53-118, 2001.

VIDA, J.B., KUROZAWA, C., ESTRADA, K.R.F.S. ; SANTOS, H.S. Manejo fitossanitário em cultivo protegido. In: Goto, R. ; Tivelli, S.W. **Produção de hortaliças em ambiente protegido: condições subtropicais**. Botucatu: UNESP, p. 53-104, 1998.

WINDHAM, M.T. ; KING, S.B. Microflora of roots of maize at seedling and silking stages in Mississippi. **Plant Disease** 67:1366-1368. 1983.