

**FRANCIELLI GASPAROTTO**

**TRANSMISSÃO E CONTROLE DE**  
***Didymella bryoniae* EM MELOEIRO NOBRE**

MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
SETEMBRO 2010

**FRANCIELLI GASPAROTTO**

**TRANSMISSÃO E CONTROLE DE  
*Didymella bryoniae* EM MELOEIRO NOBRE**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Proteção de Plantas, para obtenção do título de Doutor.

MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
SETEMBRO 2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Gasparotto, Francielli

G249t Transmissão e controle de *Didymella bryoniae* em meloeiro nobre. / Francielli Gasparotto. -- Maringá, 2010. xxi, 146 f. : il. (algumas color.), figs., quadros.

Orientador : Prof. Dr. João Batista Vida.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2010.

1. *Cucumis melo* var. *reticulatus* - Podridão gomosa. 2. *Cucumis melo* var. *reticulatus* - Patologia de sementes. 3. *Cucumis melo* var. *reticulatus* - Manejo integrado. 4. *Cucumis melo* var. *reticulatus* - Enxertia. 5. *Cucumis melo* var. *reticulatus* - Controle químico. 6. *Didymella bryoniae* - Sementes - Detecção molecular. 7. *Didymella bryoniae* - Infecção latente. 8. *Didymella bryoniae* - Infecção sistêmica.
- I. Vida, João Batista, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDD 21.ed. 632.464

**FRANCIELLI GASPAROTTO**

**TRANSMISSÃO E CONTROLE DE**  
***Didymella bryoniae* EM MELOEIRO NOBRE**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Proteção de Plantas, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em: 27 de setembro de 2010

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Solange Maria Bonaldo

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Kátia Regina Freitas SchwanEstrada

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Dauri Jose Tessmann

\_\_\_\_\_  
Pesquisadora Dr.<sup>a</sup>. Jaqueline Rosemeire Verzignassi

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. João Batista Vida  
(Orientador)

***“Aos meus pais,  
Arquimedes e Edite,  
pelo amor, compreensão, incentivo e confiança.”***

***“Aos meus irmãos,  
Kelly, Júnior, Thiago  
pelo apoio, cumplicidade, força e amizade.”***

***Dedico mais esta etapa da minha vida.***

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, pela força nos momentos difíceis e por ter me concedido mais esta vitória.

Aos meus pais e meus irmãos, pela grande paciência que tiveram comigo durante este trabalho, por todo amor e apoio.

Ao Professor Dr. João Batista Vida, pela orientação, conselhos, paciência e confiança.

Ao Professor Dr. Dauri José Tessmann, pela co-orientação, conselhos e apoio.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia (PGA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), pelas condições oferecidas para a realização do curso de Pós-graduação em nível de doutorado.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos durante o curso.

Aos professores do Departamento de Agronomia, pelos ensinamentos e amizade.

A todos meus familiares e a Maria, por sempre me incentivarem, apoiarem e pela amizade.

Aos amigos Marcelo, Mauro, Aniele e Tatiane, pela ajuda inestimável durante meus experimentos e por sempre estarem me incentivando e dando força.

À Solange, Jaqueline e Jefferson, por todos os conselhos, incentivos, ensinamentos e amizade.

À Cassia e ao Mauro César pelos esclarecimentos, ajuda nos experimentos e amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Fitopatologia, do Departamento de Agronomia, e aos funcionários da Pós-graduação em Agronomia, pela amizade e agradável convivência.

Aos funcionários do Centro Tecnológico de Irrigação (CTI) Henrique, Claudinei, Delelmo e Milton, pela ajuda e convivência agradável.

Às colegas Gabriela, Cleilton, Patrícia, Jaqueline, Marilda e Bárbara, sempre presentes em muitos desabafos e me dando força nos momentos difíceis.

Aos amigos conquistados ao longo do curso de doutorado, pela amizade e companheirismo durante todo tempo.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

FRANCIELLI GASPAROTTO, filha de Arquimedes Gasparotto e Edite Pegoraro Gasparotto, nascida em Maringá, Estado do Paraná, aos 08 dias do mês de janeiro de 1981.

Em março de 2005, graduou-se no curso de Agronomia, pela Universidade Estadual de Maringá (UEM), no Estado do Paraná.

Em novembro de 2006, concluiu o curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração de Proteção em Plantas, na Universidade Estadual de Maringá (UEM), no Estado do Paraná.

Em novembro de 2006, foi admitida no curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração em Proteção de Plantas, na Universidade Estadual de Maringá (UEM), no Estado do Paraná, submetendo-se à defesa de tese no dia 27 de setembro de 2010.



## ÍNDICE

<b>LISTA DE QUADROS .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMO DA TESE.....</b>	<b>xv</b>
<b>THESIS ABSTRACT .....</b>	<b>xviii</b>
<b>CAPÍTULO I. QUALIDADE FISIOLÓGICA E SANITÁRIA DE SEMENTES DE HÍBRIDOS DE MELOEIRO NOBRE.....</b>	<b>01</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>02</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>03</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>04</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>06</b>
2.1. Testes fisiológicos.....	06
2.1.1. Teste de germinação.....	06
2.1.2. Teste de germinação a baixa temperatura.....	07
2.1.3. Teste de deterioração controlada.....	08
2.1.4. Teste de envelhecimento acelerado.....	08
2.2. Teste de sanidade.....	09
2.3. Delineamento experimental e análise estatística.....	09
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>17</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>18</b>
<b>CAPÍTULO II. TRANSMISSÃO DE <i>Didymella bryoniae</i> EM MELOEIRO NOBRE: PLANTA MÃE-SEMENTE E SEMENTE- PLANTA.....</b>	<b>21</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>22</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>23</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
2.1. Infecção de meloeiro nobre por <i>D. bryoniae</i> para a investigação de transmissão planta-semente e semente planta.....	26
2.2. Transmissão de <i>D. bryoniae</i> planta-sementes.....	29
2.3. Transmissão de <i>D. bryoniae</i> sementes-plantas.....	31

2.4. Análise dos resultados.....	34
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
3.1. Transmissão de <i>D. bryoniae</i> planta-sementes.....	35
3.2. Transmissão de <i>D. bryoniae</i> sementes-plantas.....	36
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>44</b>
<b>CAPÍTULO III. DETECÇÃO DE <i>Didymella bryoniae</i> EM SEMENTES DE MELOEIRO POR PCR MULTIPLEX.....</b>	<b>47</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>48</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>49</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>52</b>
2.1. Teste de transmissão de podridão gomosa.....	52
2.2. Extração de DNA.....	52
2.3. PCR multiplex.....	55
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>65</b>
<b>CAPÍTULO IV. INFECÇÃO LATENTE E SISTÊMICA DE <i>Didymella bryoniae</i> EM MELOEIRO NOBRE.....</b>	<b>68</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>69</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>70</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>73</b>
2.1. Investigação do período de latência da podridão gomosa em meloeiro nobre.....	73
2.2. Infecção latente.....	74
2.2.1. Adequação do protocolo para plantas sintomáticas e assintomáticas de meloeiro nobre.....	74
2.2.2. Investigação da infecção latente a partir do colo assintomático de plântulas de meloeiro nobre.....	74
2.2.3. Investigação da infecção latente a partir de folhas de meloeiro nobre.....	75

2.3. Infecção sistêmica.....	75
2.4. Extração de DNA total.....	77
2.5. Reação de PCR multiplex.....	78
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>79</b>
3.1. Investigação do período de latência da podridão gomosa em meloeiro nobre.....	79
3.2. Infecção latente.....	80
3.2.1. Adequação do protocolo para plantas sintomáticas e assintomáticas de meloeiro nobre.....	80
3.2.2. Investigação da infecção latente a partir do colo assintomático de plântulas de meloeiro nobre.....	81
3.2.3. Investigação da infecção latente a partir de folhas de meloeiro nobre.....	82
2.3. Infecção sistêmica.....	84
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>89</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>90</b>
<b>CAPÍTULO V. CONTROLE QUÍMICO DA PODRIDÃO GOMOSA E QUALIDADE DOS FRUTOS.....</b>	<b>93</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>94</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>95</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>96</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>99</b>
2.1. Delineamento experimental.....	99
2.2. Produção de mudas.....	99
2.3. Instalação da cultura.....	100
2.4. Avaliações e análise dos resultados.....	102
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>104</b>
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>114</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>115</b>
<b>CAPÍTULO VI. EFEITO DA ENXERTIA NO CONTROLE DA PODRIDÃO GOMOSA EM MELOEIRO NOBRE.....</b>	<b>119</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>120</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>121</b>

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>122</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>124</b>
2.1. Ensaio experimental em casa-de-vegetação.....	124
2.1.1. Obtenção do isolado de <i>Didymella bryoniae</i> .....	124
2.1.2. Produção das mudas.....	124
2.1.3. Inoculação.....	126
2.1.4. Delineamento experimental.....	127
2.1.5. Avaliações e análise dos resultados.....	127
2.2. Ensaio experimental em estufa plástica.....	128
2.2.1. Produção das mudas.....	128
2.2.2. Instalação e condução da cultura.....	128
2.2.3. Delineamento experimental.....	129
2.2.4. Avaliações e análise dos resultados.....	130
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>131</b>
3.1. Ensaio experimental em casa-de-vegetação.....	131
3.2. Ensaio experimental em estufa plástica.....	134
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>142</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>143</b>

## LISTA DE QUADROS

### CAPÍTULO I

- Quadro 1.** Umidade das sementes (U), massa de 1000 sementes (M1000), massa fresca (MF), massa seca (MS) e comprimento médio das plântulas (CP), obtidos para sementes de quatro híbridos de meloeiro nobre (*Cucumis melo* var. *reticulatus*)..... 10
- Quadro 2.** Plântulas normais (%) nos testes de germinação (G), primeira contagem de germinação (PC), deterioração controlada (DC), envelhecimento acelerado (EA) e germinação a baixa temperatura (GB) para sementes de quatro híbridos de meloeiro nobre (*Cucumis melo* var. *reticulatus*)..... 11
- Quadro 3.** Incidência (%) dos fungos *Fusarium* spp. (F), *Cladosporium cucumerinum* (C), *Rhizopus* spp. (R), *Aspergillus* spp. (A) e *Penicillium* spp. (P) associados às sementes de híbridos de meloeiro nobre (*Cucumis melo* var. *reticulatus*)..... 13

### CAPÍTULO II

- Quadro 1.** Porcentagem de sementes de meloeiro nobre (*Cucumis melo* var. *reticulatus*) híbrido Sunrise com *Didymella bryoniae* associada por meio dos testes de sanidade em papel filtro e em meio de cultivo batata-dextrose-ágar (BDA)..... 35
- Quadro 2.** Transmissão de *Didymella bryoniae* por sementes de melão nobre (*Cucumis melo* var. *reticulatus*) híbrido Sunrise em substrato Plant Max HF<sup>®</sup>, areia lavada e solo-areia..... 37
- Quadro 3.** Transmissão de *Didymella bryoniae* (%) por sementes para plantas de meloeiro nobre híbrido Sunrise nos substratos ágar-água e vermiculita em câmara de incubação..... 40

### CAPÍTULO III

- Quadro 1.** Amostras positivas para o patógeno *Didymella bryoniae* em sementes de melão nobre híbrido Sunrise por PCR multiplex em relação a amostras avaliadas..... 58
- Quadro 2.** Detecção molecular de *Didymella bryoniae* associado a sementes de híbridos de meloeiro nobre por de PCR multiplex em relação a sementes infectadas de 4 a 46%..... 59

## CAPÍTULO IV

<b>Quadro 1.</b> Infecção latente de <i>Didymella bryoniae</i> em plântulas de meloeiro nobre assintomáticas do híbrido Bonus II detectada por PCR multiplex, a partir do DNA total extraído do caule.....	82
<b>Quadro 2.</b> Detecção de <i>Didymella bryoniae</i> em plântulas assintomáticas (%) de meloeiro nobre por PCR multiplex e ocorrência de sintomas em plantas adultas de meloeiro.....	83
<b>Quadro 3.</b> Detecção de infecção sistêmica de <i>Didymella bryoniae</i> em plantas de meloeiro nobre híbrido Sunrise por PCR multiplex com DNA total extraído de fragmentos de diferentes localizações no caule.....	84

## CAPÍTULO V

<b>Quadro 1.</b> Incidência (%) e severidade (área média) da podridão gomosa no caule de plantas de meloeiro nobre do híbrido Sunrise, após 93 dias do transplante.....	106
<b>Quadro 2.</b> Peso e teor de sólidos solúveis de frutos de meloeiro Nobre híbrido Sunrise, após 93 dias do transplante.....	110

## CAPÍTULO VI

<b>Quadro 1.</b> Severidade de podridão gomosa em plantas de meloeiro nobre Sunrise enxertadas em abóbora Shelper e em pé-franco e inoculadas em diferentes pontos.....	131
<b>Quadro 2.</b> Severidade de podridão gomosa e redução da área das lesões em plantas de meloeiro nobre em pé-franco e enxertadas.....	136

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

**Figura 1.** Correlação entre germinação à baixa temperatura e fungos associados às sementes dos híbridos Sunrise (A), Bonus II (B), Prince Hakucho (C) e Royal Suíte (D)..... 14

**Figura 2.** Correlação entre à germinação das sementes submetidas ao teste de envelhecimento acelerado e fungos associados às sementes dos híbridos Sunrise (A), Bonus II (B), Prince Hakucho (C) e Royal Suíte (D)..... 15

### CAPÍTULO II

**Figura 1.** Teste de sanidade em meio de cultivo batata-dextrose-ágar com sementes inteiras (A) e sementes divididas em casca e perisperma + embrião (B)..... 31

**Figura 2.** Plantas em substrato comercial (A) e em substrato areia lavada (B) em casa-de-vegetação semi-climatizada..... 32

**Figura 3.** Planta de meloeiro nobre sadia (A) e planta de meloeiro nobre com sintomas de podridão gomosa (B) no teste de sintomas em plantas em substrato vermiculita..... 39

### CAPÍTULO III

**Figura 1.** Gel de eletroforese apresentando especificidade na reação múltipla para *Didymella bryoniae* em amostras de DNA total de sementes. A) Amostras extraídas pelo protocolo SDS: 1- 100-pb ladder; 2- controle positivo; 3- controle negativo; 4 a 6- Híbrido Sunrise; 7 a 9- Híbrido Bonus II; 10 a 12- Híbrido New Prince e 13 a 15- Híbrido Louis. B) Amostras extraídas pelo protocolo CTAB: 1- 100-pb ladder; 2- controle positivo; 3- controle negativo; 4 a 6- Híbrido Sunrise; 7 a 9- Híbrido Bonus II; 10 a 12- Híbrido New Prince e 13 a 15- Híbrido Louis..... 60

### CAPÍTULO IV

**Figura 1.** Porcentagem de plantas de meloeiro nobre híbrido Sunrise com podridão gomosa em casa-de-vegetação..... 79

**Figura 2.** Gel de eletroforese apresentando especificidade na reação múltipla para *Didymella bryoniae*. A) Híbrido Sunrise: 1- 100-pb ladder; 2- Isolado de *D. bryoniae* (controle positivo); 3- controle negativo; 4- Plantas assintomáticas, 5- Plantas sintomáticas, 6- Plantas sintomáticas com corpos de frutificação; B) Híbrido Bonus II: 1. 1- 100-pb ladder; 2- Isolado

de *D. bryoniae* (controle positivo); 3- controle negativo; 4- Plantas assintomáticas, 5- Plantas sintomáticas, 6- Plantas sintomáticas com corpos de frutificação; C) Híbrido New Prince: 1- 100-pb ladder; 2- Isolado de *D. bryoniae* (controle positivo); 3- controle negativo; 4- Plantas assintomáticas, 5- Plantas sintomáticas, 6- Plantas sintomáticas com corpos de frutificação..... 81

## CAPÍTULO V

**Figura 1.** Planta de meloeiro nobre conduzida em haste única com dois frutos..... 101

**Figura 2.** Incidência de podridão gomosa em meloeiro nobre (híbrido Sunrise) em estufa plástica sob os tratamentos: **TP** - plantas originadas de sementes tratadas com carbendazim (150g/L) + tiram (350g/L) na dose 0,3+0,7g i.a./kg de sementes e pulverizadas a cada dez dias com o fungicida epoxiconazol (50g/L) + piraclostrobina (133g/L) na dose 0,1 + 0,3g i.a./L; **TNP** - plantas originadas de sementes tratadas com carbendazim (150g/L) + tiram (350g/L) na dose 0,3+0,7g i.a./kg de sementes; **NTP** - plantas originadas de sementes não tratadas e pulverizadas a cada dez dias com o fungicida epoxiconazol (50g/L) + piraclostrobina (133g/L) na dose 0,1 + 0,3g i.a./L; **NTNP** - plantas originadas de sementes não tratadas e não pulverizadas (testemunha)..... 104

**Figura 3.** Plantas de meloeiro nobre híbrido Sunrise apresentando sintomas e sinais de podridão gomosa na região das folhas cotiledonares senescentes..... 107

**Figura 4.** Severidade podridão gomosa em plantas meloeiro nobre (híbrido Sunrise) sob estufa plástica nos tratamentos: **TP** - plantas originadas de sementes tratadas com carbendazim (150g/L) + tiram (350g/L) na dose 0,3+0,7g i.a./kg de sementes e pulverizadas a cada dez dias com o fungicida epoxiconazol (50g/L) + piraclostrobina (133g/L) na dose 0,1 + 0,3g i.a./L; **TNP** - plantas originadas de sementes tratadas com carbendazim (150g/L) + tiram (350g/L) na dose 0,3+0,7g i.a./kg de sementes; **NTP** - plantas originadas de sementes não tratadas e pulverizadas a cada dez dias com o fungicida epoxiconazol (50g/L) + piraclostrobina (133g/L) na dose 0,1 + 0,3g i.a./L; **NTNP** - plantas originadas de sementes não tratadas e não pulverizadas (testemunha)..... 108

**Figura 5.** Área abaixo da curva de progresso da podridão gomosa (AACPD) em plantas de meloeiro nobre de acordo com os tratamentos: **TP** - plantas originadas de sementes tratadas com carbendazim (150g/L) + tiram (350g/L) na dose 0,3+0,7g i.a./kg de sementes e pulverizadas a cada dez dias com o fungicida epoxiconazol (50g/L) + piraclostrobina (133g/L) na dose 0,1 + 0,3g i.a./L; **TNP** - plantas originadas de sementes



tratadas com carbendazim (150g/L) + tiram (350g/L) na dose 0,3+0,7g i.a./kg de sementes; **NTP** - plantas originadas de sementes não tratadas e pulverizadas a cada dez dias com o fungicida epoxiconazol (50g/L) + piraclostrobina (133g/L) na dose 0,1 + 0,3g i.a./L; **NTNP** - plantas originadas de sementes não tratadas e não pulverizadas (testemunha)..... 109

## CAPÍTULO VI

**Figura 1.** Enxertia de plantas de meloeiro nobre híbrido Sunrise em abóbora Shelper. A) Preparo do enxerto com corte em cunha; B) Encaixe do enxerto no porta-enxerto; C) Fixação do enxerto no porta-enxerto com cliques; D) Plantas enxertadas em câmara úmida pós-enxertia..... 125

**Figura 2.** A) Planta inoculada acima do ponto de enxertia; B) Inoculação no ponto de enxertia; C) Planta inoculada abaixo do ponto de enxertia..... 126

**Figura 3.** Curvas de progresso da podridão gomosa em plantas de meloeiro nobre enxertadas e em pé-franco, inoculadas em diferentes pontos: 1- Plantas do híbrido Sunrise, enxertadas em abóbora Shelper, inoculadas no hipocótilo do enxerto; 2- Plantas do híbrido Sunrise, enxertadas em abóbora Shelper, inoculadas na região de união enxerto/porta-enxerto; 3- Plantas do híbrido Sunrise, enxertadas em abóbora Shelper, inoculadas no hipocótilo do porta-enxerto; 4- Plantas do híbrido Sunrise, em pé-franco, inoculadas no hipocótilo; 5- Plantas de abóbora Shelper, em pé-franco, inoculadas no hipocótilo..... 132

**Figura 4.** Área abaixo da curva de progresso da podridão gomosa (AACPD) em plantas de meloeiro nobre pé-franco e enxertadas de acordo com o local da inoculação: 1- Plantas do híbrido Sunrise, enxertadas em abóbora Shelper, inoculadas no hipocótilo do enxerto; 2- Plantas do híbrido Sunrise, enxertadas em abóbora Shelper, inoculadas na região de união enxerto/porta-enxerto; 3- Plantas do híbrido Sunrise, enxertadas em abóbora Shelper, inoculadas no hipocótilo do porta-enxerto; 4- Plantas do híbrido Sunrise, em pé-franco, inoculadas no hipocótilo; 5- Plantas de abóbora Shelper, em pé-franco, inoculadas no hipocótilo..... 133

**Figura 5.** Porcentagem de pegamento, após 20 dias da realização da enxertia dos híbridos de meloeiro nobre Sunrise, Bonus II, Louis e Prince Hakucho sob abóbora Shelper..... 134

**Figura 6.** Incidência de podridão gomosa em plantas de meloeiro nobre em pé-franco e enxertadas: 1- Híbrido Sunrise pé-franco; 2- Híbrido Bonus II pé-franco; 3- Híbrido Louis pé-franco; 4- Híbrido Prince Hakucho pé-franco; 5- Híbrido Sunrise enxertado em abóbora Shelper; 6- Híbrido Bonus II enxertado em abóbora Shelper; 7- Híbrido Louis enxertado em abóbora Shelper; 8- Híbrido Prince Hakucho enxertado em abóbora Shelper..... 136

<b>Figura 7.</b> Área abaixo da curva de progresso da doença podridão gomosa (AACPD) em plantas de meloeiro nobre pé-franco e enxertadas: 1- Híbrido Sunrise, pé-franco; 2- Híbrido Bonus II, pé-franco; 3-Híbrido Louis, pé-franco; 4- Híbrido Prince Hakucho, pé-franco; 5- Híbrido Sunrise, enxertado; 6- Híbrido Bonus II, enxertado; 7- Híbrido Louis, enxertado; 8- Híbrido Prince Hakucho, enxertado.....	137
<b>Figura 8.</b> Curvas de progresso da podridão gomosa em plantas de meloeiro nobre em pé-franco e enxertadas: 1- Híbrido Sunrise, pé-franco; 2- Híbrido Bonus II, pé-franco; 3-Híbrido Louis, pé-franco; 4- Híbrido Prince Hakucho, pé-franco; 5- Híbrido Sunrise, enxertado; 6- Híbrido Bonus II, enxertado; 7- Híbrido Louis, enxertado; 8- Híbrido Prince Hakucho, enxertado.....	138
<b>Figura 9.</b> Curva de progresso de podridão gomosa em plantas de meloeiro nobre Híbrido Sunrise em pé-franco e enxertadas.....	139
<b>Figura 10.</b> Curva de progresso de podridão gomosa em plantas de meloeiro nobre Híbrido Bonus II em pé-franco e enxertadas.....	140
<b>Figura 11.</b> Curva de progresso de podridão gomosa em plantas de meloeiro nobre Híbrido Louis em pé-franco e enxertadas.....	140
<b>Figura 12.</b> Curva de progresso de podridão gomosa em plantas de meloeiro nobre Híbrido Prince Hakucho em pé-franco e enxertadas.....	141

## RESUMO DA TESE

GASPAROTTO, Francielli. **TRANSMISSÃO E CONTROLE DE *Didymella bryoniae* EM MELOEIRO NOBRE.** Universidade Estadual de Maringá, setembro de 2010. Professor Orientador: João Batista Vida. Professor Co-orientador: Dauri José Tessmann.

O meloeiro pertence à família Cucurbitaceae e gênero *Cucumis* e espécie *Cucumis melo* L. Este fruto é muito apreciado e de consumo ascendente no Brasil. No Paraná, cultivam-se melões aromáticos, principalmente, em ambiente protegido, ou seja, em estufas plásticas. Entre as principais doenças do melão destaca-se a podridão gomosa, causada pelo fungo *Didymella bryoniae* (anamorfo: *Ascochyta cucumis*). Danos de até 100% em plantas de meloeiro têm sido relatados sob alto nível de inóculo e condições ambientais favoráveis. Os sintomas mais frequentes correspondem a tombamento e cancro, com exsudação de goma no caule. *D. bryoniae* sobrevive em plantas daninhas e cultivadas, restos de cultura, solo infestado e em sementes. As sementes são a principal forma de introdução do patógeno em novas áreas. O controle pode ser feito por meio de uso de sementes livres do patógeno, rotação de culturas, eliminação de cucurbitáceas silvestres, esterilização do solo de cultivo e irrigação adequada. Embora existam relatos de resistência genética em cucurbitáceas, nenhum híbrido comercial de melão é resistente à doença. Recomenda-se, também, o tratamento de sementes e o controle com fungicidas registrados para a cultura, sendo estas as formas de controle mais utilizadas. Apesar da importância da cultura de meloeiro nobre em cultivo protegido e da podridão gomosa ser uma das principais doenças da cultura, este é um patossistema pouco estudado no mundo e, principalmente, no Brasil. Face à escassez de dados, esse trabalho objetivou estudar a transmissão de *D. bryoniae* para sementes e de sementes para planta, a biologia e o controle da podridão gomosa em meloeiro nobre. O trabalho foi constituído de seis capítulos: No Capítulo I, estudou-se a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de quatro híbridos de meloeiros nobres (Sunrise, Bonus II, Royal Suíte e Prince Hakucho) através dos testes de germinação, primeira contagem de germinação, deterioração controlada, envelhecimento acelerado,

germinação a baixa temperatura e sanidade. Os testes de envelhecimento acelerado e germinação a baixa temperatura apresentaram sensibilidade suficiente para avaliação do potencial fisiológico das sementes, sendo que as sementes do híbrido Bonus II apresentaram maior vigor e as sementes do híbrido Prince Hakucho menor vigor. Os lotes de sementes com maior índice de associação de patógenos apresentaram menor qualidade fisiológica. No Capítulo II, estudaram-se as vias de transmissão de *D. bryoniae* da planta mãe para sementes em cultura de meloeiro nobre e a transmissão do patógeno das sementes produzidas para plantas. Foram utilizados cinco tratamentos: plantas com flores inoculadas (T1); plantas pulverizadas com a mistura epoxiconazol + piraclostrobina com flores inoculadas (T2); plantas pulverizadas com frutos inoculados (T3); plantas pulverizadas com caule inoculado (T4) e plantas sem inoculação com o patógeno *D. bryoniae* (T5), sendo que não foi possível a avaliação das sementes do T3, pois ocorreu podridão dos frutos após a inoculação com o patógeno. A infecção de sementes de meloeiro nobre por *D. bryoniae* ocorreu por mais de uma rota, sistemicamente, através da planta mãe, ou através da flor feminina. Mesmo o patógeno não causando danos aos frutos e as sementes, este foi transmitido de sementes infectadas/infestadas para plantas. No Capítulo III, estudou-se a detecção de *D. bryoniae* em sementes de meloeiro nobre por PCR multiplex. Para isso, avaliaram-se três métodos de extração de DNA (SDS, CTAB e Guanidina), três tamanhos de amostra de sementes (50, 100 e 200) e sementes em três condições (sem embebição, embebidas por 24 h, embebidas por 48h). Foi possível a detecção de *D. bryoniae* em sementes de meloeiro nobre através da técnica de PCR multiplex em lotes de sementes com índice de associação de 4 a 46%. No capítulo IV, estudou-se a ocorrência de infecção latente e sistêmica de *D. bryoniae* em plantas de meloeiro nobre através da detecção do patógeno por PCR multiplex utilizando oligonucleotídeos específicos previamente desenvolvidos. Foi constatada a presença de *D. bryoniae* no caule e folhas cotiledonares de plantas assintomáticas através de PCR multiplex comprovando a ocorrência de infecção latente do patógeno. Constatou-se também a ocorrência de infecção sistêmica de *D. bryoniae* através da detecção do patógeno em fragmentos assintomáticos localizados a 5, 15 e 30 cm do

tecido sintomático em plantas de meloeiro nobre. No Capítulo V, foi estudado o controle químico da podridão gomosa na cultura de meloeiro nobre sob estufa plástica, utilizando-se do tratamento de sementes com carbendazim (150 g/L) + tiram (350 g/L) na dose 0,3 + 0,7g i.a./kg de sementes e pulverização foliar a cada dez dias com o fungicida epoxiconazol (50 g/L) + piraclostrobina (133 g/L) na dose 0,1 + 0,3g i.a./L e avaliou-se também a qualidade dos frutos produzidos em cada tratamento. O tratamento de semente com carbendazim + tiram associado à pulverização na cultura com o fungicida epoxiconazol + piraclostrobina constituíram em eficiente estratégia para o controle da podridão gomosa em melão nobre Sunrise cultivado em estufa plástica e na melhora da qualidade dos frutos produzidos. No Capítulo VI, estudou-se o efeito da enxertia no controle à podridão gomosa em plantas de melão nobre enxertadas em abóbora imune à *D. bryoniae*. A enxertia em cavalo imune proporcionou redução da severidade da doença nas plantas de meloeiro nobre Sunrise em relação as plantas pé-franco cultivadas tanto em casa-de-vegetação quanto em estufa plástica.

**Palavras-chave:** *Cucumis melo* var. *reticulatus*, podridão gomosa, patologia de sementes, manejo integrado.

## THESIS ABSTRACT

GASPAROTTO, Francieli. **TRANSMISSION TO SEEDS AND CONTROL OF *Didymella bryoniae* IN MUSKMELON.** Universidade Estadual de Maringá, September 2010. Adviser: João Batista Vida. Co-adviser: Dauri José Tessmann Dauri José

The melon belongs to the Cucurbitaceae family, genus and species *Cucumis melo* L. This vegetable is much appreciated and your consumption is rising in Brazil. In Paraná, aromatic melons are grown mainly at environment protected, in plastic greenhouse, this mode was introduced in the 80s as a new activity to diversify the farm. Among the major diseases of melon, the gummy stem blight stands out, caused by the fungus *Didymella bryoniae* (anamorph: *Ascochyta cucumis*). Damages of up to 100% in melon plants have been reported under high inoculum and favorable environmental conditions. The most frequent symptoms are "damping off" with cancer and gum exudation on stem. *D. bryoniae* survives in weeds and cultivated cucurbits, crop residues, infested soil and seeds. The seeds are the main way of introducing the pathogen into new areas. The control can be done through crop rotation, elimination of wild cucurbits, sterilization of soils and adequate irrigation. Although there are reports of resistance in cucurbits, none hybrid melon is highly resistant to disease. It is also recommended seed treatment and control with fungicides registered for culture, this being the most widely used form of control. Despite the importance of culture of muskmelon in greenhouse and gummy stem blight, a major disease of culture, this is a little studied pathosystem in the world and especially in Brazil. Given the scarcity of data, this study had the objective to investigate the transmission of *D. bryoniae* to seed, the biology and control of gummy stem blight on muskmelon. The work was composed of six chapters: In Chapter I, was studied the physiological and sanitary quality seeds of four hybrids of muskmelon (Sunrise, Bonus II, Royal Suite and Prince Hakucho) through the test germination, first germination count, controlled deterioration, accelerated aging, germination at low temperature and sanity. The accelerated aging tests and cool germination were sensitive enough to evaluate the physiological potential of seeds, seeds of hybrid Bonus II had higher vigor and

seeds of hybrid Prince Hakucho had smaller vigor. The seeds lots with the highest association of pathogens showed less physiological quality.

In Chapter II, was studied the transmission routes of *D. bryoniae* of the mother plant to seed of muskmelon culture and transmission of disease from produced seed to plant. Five treatments were used to evaluate routes of transmission of disease from the mother plant to seeds (T1, T2, T3, T4, T5). To evaluate the association of the pathogen with seeds were used sanity tests on filter paper and on potato dextrose agar (PDA) using whole seeds and divided. The transmission of disease to plants was evaluated through tests of symptoms in plants at commercial substrate, sand and soil and sandy in greenhouse, and water-agar substrate and vermiculite in incubation chamber. It was not possible to evaluate the seeds of the T3, because occurred fruit rot after inoculation. The pathogen *D. bryoniae* was not detected associated with the seeds of the four treatments via the sanity test on filter paper, in BDA, the pathogen was detected in seeds from the T1, T2, T4 and T5. In all three tests symptoms on plants in greenhouse was possible to detect the transmission of *D. bryoniae* seeds for the plants from the T1, T2, T4 and T5. In tests in the incubation chamber also showed the pathogen transmission from seeds to plants in the two substrates for T1, T2, T4 and T5. Infection of melon seeds by *D. bryoniae* can occur for more than one route, systemically through the plant's parent or through the female flower. Same pathogen causing no damage to fruit and seeds, it is transmitted from seeds, causing damage to the field. In Chapter III, was studied the detection of *D. bryoniae* in muskmelon seeds by multiplex PCR. For this, it was evaluated three methods of DNA extraction (SDS, CTAB and Guanidine) and three sample sizes of seeds (50, 100 and 200) for developing a method of detecting *D. bryoniae* in muskmelon seeds by multiplex PCR using specific primers previously designed to detect the pathogen in symptomatic stems of cucurbits. The protocols based on the detergent SDS and the detergent CTAB worked successfully in the extraction of DNA from seed lots. It was possible to detect *D. bryoniae* in muskmelon seeds by multiplex PCR in seed lots with a rate of association of 4 to 46%. In chapter IV, was studied the occurrence of latent infection and systemic *D. bryoniae* muskmelon plants by detecting the pathogen by multiplex PCR using specific primers previously developed. The

presence of *D. bryoniae* was proved in stem and cotyledons of asymptomatic plants by multiplex PCR proving the occurrence of latent infection of the pathogen. Was found the incidence of systemic infection of *D. bryoniae* by detecting the pathogen in asymptomatic fragments located 5, 15 and 30 cm from distance of symptomatic tissue. In Chapter V, was studied the chemical control of gummy stem blight in the culture of muskmelon in plastic greenhouse, using seed treatment with carbendazim (150 g/L) + thiram (350 g/L) with dose of 0,3 + 0,7g i.a./kg seed and foliar spraying every ten days with fungicide epoxiconazol (50 g/L) + pyraclostrobin (133 g/L) at concentration of 0,1 + 0,3g i.a./L and quality of produced fruits. Was used the following treatments: TP - treated seed and sprayed plants; NPT - treated seeds and plants without spraying; NTP - untreated seeds and plants sprayed; NTNP - untreated seeds and plants not sprayed (control). Seed treatment with carbendazim + thiram associated with spraying the crop with fungicide pyraclostrobin + epoxiconazole constituted an efficient strategy for the control of gummy stem blight on muskmelon Sunrise grown in plastic greenhouse and in improving fruit quality. In Chapter VI, studied the effect of grafting on the control of gummy stem blight in muskmelon plants grafted onto immune pumpkin to *D. bryoniae*. The grafting on rootstock immune caused a reduction in disease severity in plants of muskmelon Sunrise over ungrafted plants of the same hybrid, both grown in condition green-house and in plastic greenhouses.

**Keywords:** *Cucumis melo* var. *reticulatus*, gummy stem blight, seed pathology, integrated pest management.



## **CAPÍTULO I**

# **QUALIDADE FISIOLÓGICA E SANITÁRIA DE SEMENTES DE HÍBRIDOS DE MELOEIRO NOBRE**

## RESUMO

Sementes de boa qualidade constituem variável muito importante na cadeia produtiva de melão. Este trabalho objetivou avaliar as qualidades fisiológica e sanitária de lotes de sementes de quatro híbridos de meloeiro nobre (*Cucumis melo* var. *reticulatus*) comercializados no Brasil: Bonus II, Sunrise, Royal Suíte e Prince Hakucho; comparando também a eficiência dos testes fisiológicos utilizados. As sementes foram submetidas aos testes de germinação, primeira contagem de germinação, deterioração controlada, envelhecimento acelerado, germinação a baixa temperatura e sanidade. Os testes de envelhecimento acelerado e germinação a baixa temperatura apresentaram sensibilidade suficiente para avaliação do potencial fisiológico de sementes de meloeiro nobre dos híbridos testados. As sementes de maior vigor foram as do híbrido Bonus II e as de menor vigor as do híbrido Prince Hakucho. Os patógenos *Cladosporium cucumerinum*, *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp., *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. foram detectados em associação com as sementes dos híbridos avaliados. Os lotes de sementes com menor vigor apresentaram maior porcentagem de fungos associados as suas sementes, sugerindo que patógenos associados podem reduzir a sua qualidade fisiológica.

**Palavras-chave:** *Cucumis melo*, sanidade, vigor.

## ABSTRACT

**Physiological and sanitary quality of muskmelon hybrids seeds.** Seeds of good quality are a very important variable in the production chain of melon. Therefore, this study aimed to evaluate the physiological and sanitary quality of muskmelon seeds (*Cucumis melo* var. *reticulatus*). Four hybrids seeds were evaluated: Bonus II, Sunrise, Royal Suite and Prince Hakucho. The seeds were subjected to tests of germination, first count of germination, controlled deterioration, accelerated aging, germination at low temperature and health. The results showed that the tests of accelerated aging and germination at low temperature have sufficient sensitivity to evaluate the physiological potential of seeds from muskmelon. The hybrid of greater vigour was Bonus II and with the less vigour was the New Prince. The pathogens *Cladosporium cucumerinum*, *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp., *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. were detected in association with the seed of hybrids evaluated. The seed lots with less force had higher percentages of fungi associated with seeds, suggest that pathogens can reduce their prime physiological seed quality.

**Keywords:** *Cucumis melo*, sanity, vigour.

## 1. INTRODUÇÃO

O meloeiro pertence à família *Cucurbitaceae*, gênero *Cucumis* e espécie *Cucumis melo* L. Sua origem ainda não está bem definida; alguns autores acreditam que seja a África, enquanto outros atribuem ao oeste da Ásia. Sua introdução no Brasil ocorreu pelos imigrantes europeus em meados da década de 60, no Rio Grande do Sul, expandindo-se para o estado de São Paulo e, posteriormente, para as regiões Norte e Nordeste, destacando-se, em termos de área plantada e produção, entre as décadas de 80 e 90 (ARAÚJO, 1980; FERREIRA; PEDROSA, 1982).

Existe grande número de cultivares e híbridos de meloeiro, que pertencem a duas variedades botânicas: *C. melo* var. *reticulatus*, melões aromáticos; e *C. melo* var. *inodorus*, que possui grande variabilidade de forma, tamanho, cor de casca, cor e firmeza da polpa, entre outras características distintivas (ALVES, 2000).

Os chamados melões nobres (*C. melo* var. *reticulatus*) se destacam dos demais pela sua qualidade superior em aroma, consistência de polpa, aspecto visual e teor de sólidos solúveis (BRANDÃO FILHO; CALLEGARI, 1999). Devido à exigência de alta tecnologia para seu cultivo, os melões nobres constituem-se em importante cultura no agronegócio da agricultura protegida no Estado do Paraná, sendo cultivados nas estações mais quentes do ano (VIDA et al., 2001; GASPAROTTO, 2006).

O custo das sementes é uma das mais importantes variáveis da cadeia produtiva dos melões nobres. Para os híbridos mais cultivados em ambiente protegido no Brasil, entre eles Bonus II, Sunrise, Prince Hakucho, Royal Suíte e Louis, as sementes são importadas, principalmente do Japão e China. Como se trata de material importado, pouco se conhece sobre sua qualidade. Geralmente, nas embalagens das sementes importadas desses híbridos, encontram-se apenas informações relacionadas ao prazo de validade e índice de germinação, não constando dados sobre o vigor e qualidade sanitária. Informações sobre o vigor são importantes para sementes de maior valor comercial, como as hortaliças, em função de seu tamanho, volume limitado de reservas armazenadas e propensão à deterioração (MARCOS FILHO, 2001).

Informações sobre a sanidade do lote de sementes também são importantes, visto que estas podem se constituir em eficiente meio de disseminação e transmissão de patógenos e/ou sua introdução em novas áreas (MENTEN, 1995). Gasparotto et al. (2009), por exemplo, analisando a sanidade de lotes de sementes importadas de meloeiro, observaram elevados índices de *D. bryoniae*, com 59% para Sunrise, 48% para Bonus II e 21% para Prince Hakucho.

Além dos problemas de sanidade, patógenos associados às sementes podem reduzir a qualidade fisiológica das mesmas, afetando a germinação e o vigor das plantas. Para análise de qualidade de sementes recomenda-se o emprego conjunto de testes de sanidade e de qualidade fisiológica (NEERGAARD, 1979; MENTEN, 1995). Para meloeiro nobre, poucos trabalhos foram desenvolvidos abordando este tema. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a qualidade fisiológica e sanitária de sementes dos híbridos de meloeiro nobre mais cultivados em ambiente protegido no Brasil e comparar a eficiência dos testes fisiológicos utilizados.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Para o desenvolvimento do trabalho foram utilizadas sementes de melão nobre dos híbridos Bonus II, Sunrise, Prince Hakucho e Royal Suíte, adquiridas em estabelecimentos comerciais no Estado do Paraná, Brasil. Os testes para avaliar a qualidade fisiológica foram germinação, primeira contagem de germinação, deterioração controlada, envelhecimento acelerado, germinação a baixa temperatura e para a avaliação da qualidade sanitária empregou-se o teste de sanidade em papel filtro com congelamento.

O grau de umidade das sementes foi determinado empregando-se o método de estufa a 105°C, como descrito pelas Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009a). Para cada híbrido avaliado foram utilizadas duas amostras constituídas de 2g. As sementes foram acondicionadas em recipientes metálicos, pesadas e colocadas para secagem em estufa com circulação forçada de ar a  $105 \pm 3^\circ\text{C}$ , por 24 horas. Em seguida, procedeu-se nova pesagem das amostras. O grau de umidade de cada amostra foi calculado conforme descrito nas RAS. Os resultados foram expressos em porcentagem média de umidade para cada lote de sementes de cada híbrido.

A massa de mil sementes foi determinada pela pesagem de quatro repetições de 100 sementes para cada híbrido, utilizando-se balança analítica com precisão de um miligrama. O resultado de cada pesagem foi multiplicado por 10 para se obter o peso de mil sementes. Os resultados foram expressos pela massa média de mil sementes (g) (BRASIL, 2009a).

### **2.1. Testes fisiológicos**

#### **2.1.1. Teste de germinação**

O teste de germinação foi realizado conforme estabelecido pelas RAS (BRASIL, 2009a), empregando-se quatro repetições de 100 sementes em sub-repetições de 50 sementes para cada híbrido. As sementes foram semeadas em rolo de papel toalha umedecido em quantidade de água equivalente a 2,5 vezes a sua massa e colocadas em germinador do tipo Mangelsdorf, a

temperatura constante de 25°C. As avaliações foram realizadas aos quatro e oito dias após a semeadura, seguindo os critérios estabelecidos em BRASIL (2009a). Os resultados foram expressos em percentagem média de plântulas normais para cada híbrido.

A primeira contagem de germinação foi realizada conjuntamente com o teste de germinação e constituiu-se na avaliação da porcentagem de plântulas normais obtidas no quarto dia após a semeadura (BRASIL, 2009a).

Quando da primeira contagem, avaliou-se o comprimento médio das plântulas, com o auxílio de uma régua milimetrada. Os resultados foram expressos em comprimento médio das plântulas em centímetros para cada híbrido.

Ainda quando da primeira contagem, avaliou-se a massa fresca das plântulas, que foi realizada conjuntamente ao teste de comprimento das plântulas. Após a medição do comprimento das plântulas, estas foram acondicionadas em sacos de papel e pesadas em balança analítica de precisão. Os resultados foram expressos pela média da massa (g) das quatro amostras para cada híbrido.

A determinação da massa seca das plântulas foi realizada conjuntamente com a massa fresca. Os sacos de papel contendo as plântulas foram colocados em estufa com circulação forçada de ar a 70°C, por 24 horas. Após este período, as amostras foram retiradas, resfriadas em dessecador, sendo, em seguida, pesadas em balança de precisão para determinação da massa seca média (g) das plântulas para cada híbrido (BRASIL, 2009a).

### **2.1.2. Teste de germinação a baixa temperatura**

O teste de germinação a baixa temperatura foi realizado empregando rolo de papel toalha como substrato, utilizando-se quatro repetições de 100 sementes para cada híbrido. As sementes foram distribuídas sobre o papel umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes ao seu peso. Após a semeadura, procedeu-se o enrolamento de cada folha e os rolos foram colocados no interior de sacos plásticos vedados e mantidos em germinador, a 18°C, por sete dias, conforme descrito por Muniz et al. (2004). Para a

avaliação, considerou-se a porcentagem de plântulas normais. Consideraram-se normais as plântulas que apresentavam todas as suas estruturas essenciais bem desenvolvidas, completas, proporcionais e saudáveis.

### **2.1.3. Teste de deterioração controlada**

Este teste foi realizado de acordo com metodologia descrita por Bhering et al. (2004). Inicialmente, o teor de água das sementes foi elevado para 24%, distribuindo-se quatro repetições de 100 sementes de cada híbrido sobre uma folha de papel toalha umedecida em caixas plásticas gerbox, mantidas em germinador, a 25°C. Durante o umedecimento, o grau de umidade das sementes foi monitorado por meio da realização de pesagens sucessivas, até se obter o valor desejado. Em seguida, as sementes de cada amostra foram colocadas em sacos aluminizados, que foram vedados e mantidos em geladeira, a 10°C, por 24 horas. Após este período, as embalagens contendo as sementes permaneceram em banho-maria, a 45°C, por 48 horas. Posteriormente, as embalagens foram colocadas em recipiente contendo água, por 30 minutos, para a redução da temperatura. Em seguida, o teste de germinação foi instalado, conforme metodologia descrita anteriormente e para a avaliação considerou-se o percentual de plântulas normais aos oito dias.

### **2.1.4. Teste de envelhecimento acelerado**

Este teste foi conduzido conforme a metodologia descrita por Muniz et al. (2004). Foram utilizadas quatro repetições de 100 sementes para cada híbrido, distribuídas sobre telas de alumínio, fixadas no interior de caixas plásticas gerbox, a 41°C e 100% de umidade relativa, por 48 horas. Após esse período, as sementes foram colocadas para germinar, seguindo-se as recomendações para o teste de germinação. A avaliação das plântulas foi realizada aos quatro dias, calculando-se a porcentagem de plântulas normais. O grau de umidade foi determinado pelo método da estufa a  $105 \pm 3^\circ\text{C}$ , por 24 horas (BRASIL, 2009a).



## **2.2. Teste de sanidade**

O teste de sanidade foi realizado empregando-se o método de papel filtro com congelamento como descrito por NEERGAARD (1979) e indicado pelo manual de análise sanitária de sementes (BRASIL, 2009b). Para a análise foram utilizadas 400 sementes por híbrido, distribuídas em quatro repetições de 100 sementes, as quais foram colocadas em gerbox contendo quatro folhas de papel filtro umedecidas com água destilada esterilizada. Os recipientes contendo as sementes foram colocados em câmara de incubação com temperatura de  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas, sob regime de luminosidade de 12 horas de luz fluorescente e 12 horas de escuro. Após este período, as sementes foram transferidas para freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas. Em seguida, o material foi incubado novamente a  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sob o regime de luminosidade como descrito anteriormente, por cinco dias. Após o período de incubação, cada semente foi examinada sob microscópio estereoscópico. Para as sementes nas quais se observou a presença de quaisquer estruturas fúngicas, prepararam-se lâminas, as quais foram observadas ao microscópio óptico com a finalidade de identificação do fungo associado, por meio da morfologia das estruturas presentes. Os resultados foram expressos em percentual de sementes com fungo associado.

## **2.3. Delineamento experimental e análise estatística**

Para todos os ensaios experimentais, utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Quando necessário os resultados foram transformados em  $x^{1/2}$ , submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos agrupadas pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) utilizando-se o sistema para análise de variância para dados balanceados SISVAR (FERREIRA, 2003).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os lotes de sementes dos híbridos de meloeiro avaliados apresentaram diferença quanto ao grau de umidade inicial de suas sementes, embora com pequenas variações, com valores entre 9,2% e 11,1% (Quadro 1). Na avaliação do vigor, o grau de umidade inicial das sementes é um fator importante, uma vez que sua uniformização é imprescindível para a padronização das avaliações e obtenção de resultados consistentes (MARCOS FILHO et al., 1987).

**Quadro 1.** Umidade das sementes (U), massa de 1000 sementes (M1000), massa fresca (MF), massa seca (MS) e comprimento médio das plântulas (CP), obtidos para sementes de quatro híbridos de meloeiro nobre (*Cucumis melo* var. *reticulatus*).

Híbrido	U (%)	M1000 (g)	MF (g)	MS (g)	CP (cm)
Royal Suíte	9,2 b*	28,33 a	1,29 a	0,37 a	11,16 a
Sunrise	11,1 a	24,84 a	0,91 b	0,23 b	9,94 a
Bonus II	10,9 a	20,47 b	0,85 b	0,19 b	10,00 a
Prince Hakucho	11,0 a	12,08 c	0,88 b	0,16 b	9,78 a
<b>CV (%)</b>	1,12	3,03	13,07	28,13	11,35

\*Para a análise estatística os dados foram transformados em  $y = x^{1/2}$ .

Média de quatro repetições. Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott, em nível de 5% de probabilidade.

Quanto à massa de mil sementes também houve diferenças entre os lotes de sementes dos híbridos. O menor valor foi observado para o híbrido Prince Hakucho (12,08g) e o maior valor para o híbrido Royal Suíte (28,33g). Dentro de cada híbrido houve uniformidade no tamanho das sementes, fato demonstrado pelo baixo coeficiente de variação (3,03%). As plântulas do híbrido Royal Suíte apresentaram maior massa fresca (1,29g) e maior massa seca (0,37g), diferenciando-se dos demais híbridos. No entanto, as diferenças nas variáveis massa de 1000 sementes, massa fresca e massa seca de plântulas existentes entre os híbridos não refletiram em diferenças no comprimento das plântulas, pois não houve diferenças significativas entre eles.

Os resultados dos testes de germinação e vigor para a avaliação da qualidade das sementes dos híbridos de meloeiro encontram-se no Quadro 2. Verificou-se que, com exceção dos testes de envelhecimento acelerado e germinação a baixa temperatura, não ocorreram diferenças entre os quatro híbridos. Segundo Marcos Filho et al. (1987) para avaliação do vigor, é importante a comparação de lotes de sementes com germinação semelhante, pois os testes de vigor podem detectar diferenças não verificadas no teste de germinação.

Na primeira contagem de germinação não foram verificadas diferenças de vigor entre os híbridos avaliados. Segundo relatado por Delouche; Baskin e citado por Bhering et al. (2003), embora a primeira contagem de germinação possa ser considerada um indicativo de vigor, o teste é baseado na velocidade de germinação e não está entre os primeiros eventos do processo de deterioração das sementes. Daí a menor eficiência deste teste em detectar diferenças significativas de vigor entre as sementes.

**Quadro 2.** Plântulas normais (%) nos testes de germinação (G), primeira contagem de germinação (PC), deterioração controlada (DC), envelhecimento acelerado (EA) e germinação a baixa temperatura (GB) para sementes de quatro híbridos de meloeiro nobre (*Cucumis melo var. reticulatus*).

Híbrido	G (%)	PC (%)	DC (%)	EA (%)	GB (%)
Royal Suíte	94 a*	86 a	29 a	56 b	39 b
Sunrise	91 a	71 a	32 a	80 a	43 b
Bonus II	90 a	70 a	34 a	79 a	64 a
Prince Hakucho	88 a	67 a	21 a	62 b	32 b
<b>CV (%)</b>	5,51	4,43	31,01	14,16	27,83

\*Para a análise estatística os dados foram transformados em  $y = x^{1/2}$ .

Média de quatro repetições. Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott, em nível de 5% de probabilidade.

Da mesma forma que no teste de germinação e primeira contagem de germinação, o teste de deterioração controlada também não foi eficiente para diferenciar as sementes dos quatro híbridos de meloeiro nobre quanto ao vigor. Bhering et al. (2004), no entanto, constataram a eficiência deste teste para a separação de lotes de sementes de melão valenciano quanto ao vigor, sob as

mesmas condições de trabalho. Muniz et al. (2004), observaram diferenças de vigor entre os lotes de sementes de melão valenciano através do teste de deterioração controlada, ajustando o grau de umidade das sementes para 19%, antes da realização do teste, empregando temperatura constante de 45°C, por 48 horas.

Os resultados obtidos para o teste de envelhecimento acelerado indicaram que as sementes dos híbridos Sunrise e Bonus II foram mais vigorosas e as sementes dos híbridos Prince Hakucho e Royal Suíte, as menos vigorosas (Quadro 2). Verificou-se que o período de 48 horas e a temperatura de 41°C foram eficientes na separação dos lotes quanto ao vigor das sementes. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Torres (2002) e Muniz et al. (2004), avaliando lotes de sementes de melão, e os obtidos por Bhering et al. (2003), avaliando lotes de sementes de melancia.

No teste de germinação a baixa temperatura foi possível diferenciar o híbrido mais vigoroso (Bonus II), sendo que os outros três híbridos não diferiram entre si (Quadro 2). Do mesmo modo, Bhering et al. (2000), trabalhando com lotes de sementes de pepino, verificaram que a germinação a baixa temperatura indicou apenas o melhor e o pior lote, não constatando diferenças entre os demais. Porém, trabalhando com sementes de melancia, Bhering et al. (2003) verificaram que o teste de germinação a baixa temperatura permitiu constatar diferenças significativas entre os quatro híbridos testados, classificando-os em diferentes níveis de vigor.

Quanto ao teste de sanidade (Quadro 3), foram detectados os seguintes patógenos associados às sementes dos quatro híbridos de meloeiro nobre: *Fusarium* spp., *Cladosporium cucumerinum*, *Rhizopus* spp., *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. O fungo *C. cucumerinum* é o agente causal da sarna, importante doença das cucurbitáceas, que causa lesões nas folhas, pecíolos, caules e frutos de plantas de abóbora, abobrinha, melão e melancia, sendo mais severo em pepino (REGO, 1995). O patógeno *Fusarium oxysporum* é importante para as culturas de melão e melancia, podendo causar marchas vasculares e tombamento de plântulas em suas formas anamórficas *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, sendo as sementes o principal veículo de disseminação e sobrevivência (REGO, 1995).

*Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. são fungos de armazenamento, típicos causadores de podridão em sementes e responsáveis por reduções na viabilidade e longevidade (MACHADO, 1988).

**Quadro 3.** Incidência (%) dos fungos *Fusarium* spp. (F), *Cladosporium cucumerinum* (C), *Rhizopus* spp. (R), *Aspergillus* spp. (A) e *Penicillium* spp. (P) associados às sementes de híbridos de meloeiro nobre (*Cucumis melo* var. *reticulatus*).

Híbrido	Incidência de fungos (%)					Total
	F	C	R	A	P	
Royal Suíte	5,0	-	3,5	6,5	2,0	17,0 b*
Sunrise	2,5	1,0	1,5	-	0,5	5,5 c
Bonus II	1,5	0,5	1,0	-	-	3,0 d
Prince Hakucho	14,5	3,5	8,0	5,0	1,0	32,0 a
<b>CV (%)</b>						11,2

\*Para análise estatística os dados foram transformados em  $y = x^{1/2}$ .

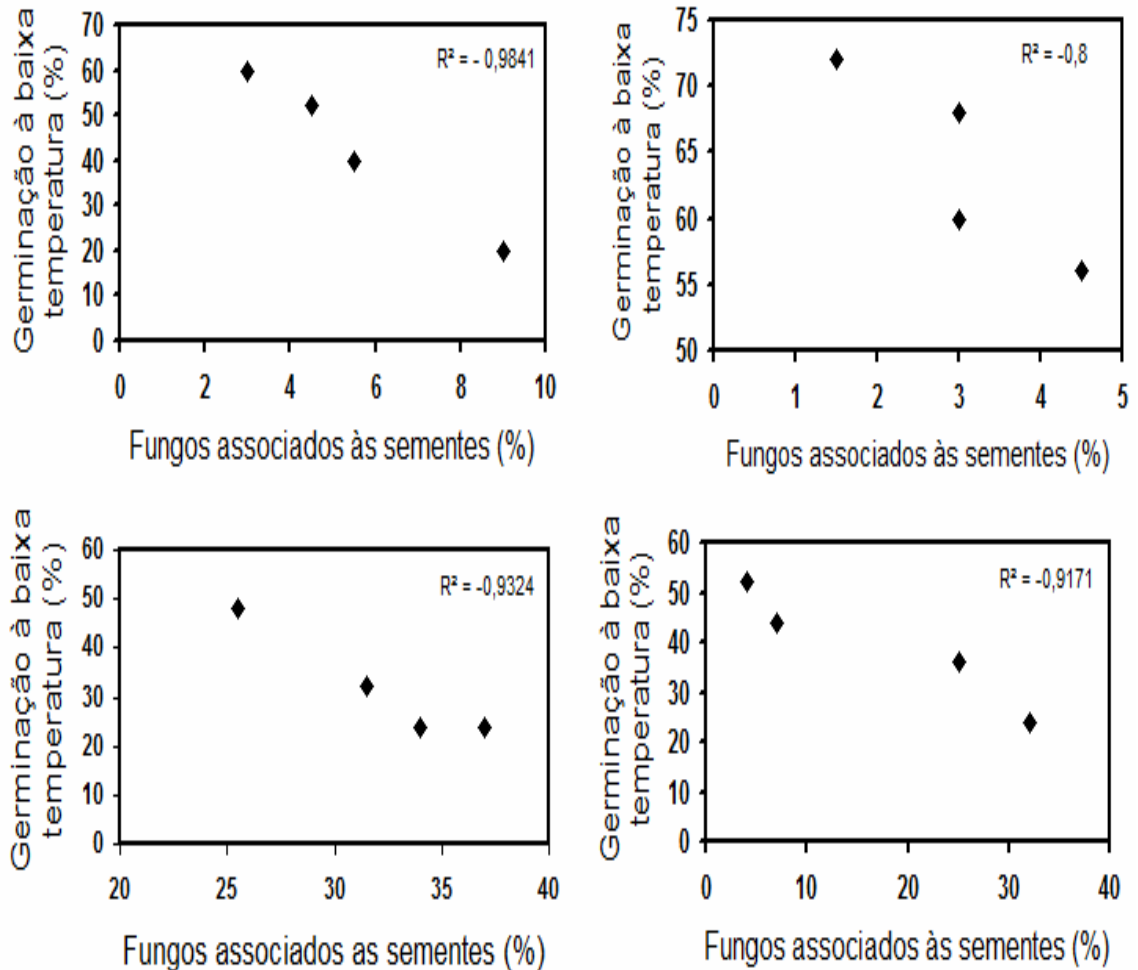
Média de quatro repetições. Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott, em nível de 5% de probabilidade.

Quanto à incidência, o híbrido que apresentou maior porcentagem de sementes com patógenos associados foi Prince Hakucho (32%), seguido pelo híbrido Royal Suíte com 17% de sementes com patógenos associados. O híbrido com menor porcentagem de sementes com fungos associados foi o Bonus II (3,0%), seguido pelo híbrido Sunrise (5,5%).

A correlação entre os valores médios do teste de germinação à baixa temperatura e da porcentagem total de fungos associados a cada lote de sementes foi alta e negativa para todos os híbridos avaliados, com valores de -0,9841, -0,8, -0,9324 e -0,9171 para os híbridos Sunrise, Bonus II, Prince Hakucho e Royal Suíte, respectivamente.

De acordo com esses valores, quanto maior a porcentagem de fungos associados às sementes, menor o vigor das mesmas, sugerindo que os patógenos associados às sementes poderiam estar interferindo na sua qualidade. Corroborando com estes resultados, Muniz et al. (2004) constataram, em sementes de melão das cultivares Carvalho e Gaúcho, a

presença dos patógenos *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus* spp., interferindo na qualidade fisiológica das mesmas.

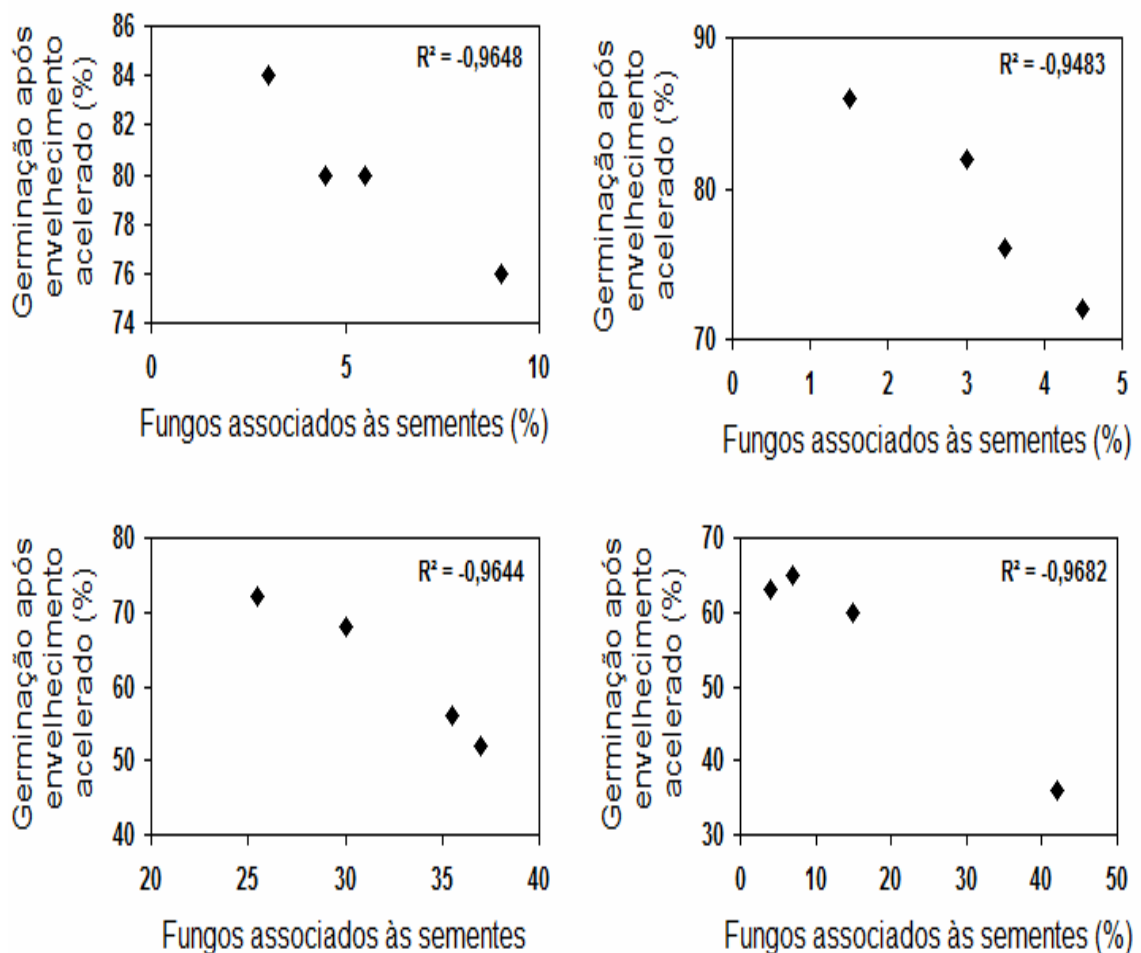


**Figura 1.** Correlação entre germinação a baixa temperatura e fungos associados às sementes dos híbridos Sunrise (A), Bonus II (B), Prince Hakucho (C) e Royal Suíte (D).

Por meio do teste de sanidade utilizado no trabalho, ou seja, papel filtro com congelamento, recomendado para análise sanitária de sementes de melão (BRASIL, 2009b) não foi detectado o patógeno *D. bryoniae*, associado aos lotes de sementes analisados. Gasparotto et al. (2009) também descreveram a inadequação do teste para a constatação de *D. bryoniae* associado às sementes dos híbridos de meloeiro nobre Bonus II, Sunrise e Prince Hakucho,

com alta frequência de resultados falsos negativos. Este patógeno é o mais importante para meloeiro em cultivo protegido no Estado do Paraná, sendo responsável por danos de até 100% (VIDA et al., 1993), além de sua grande importância para as culturas de pepino, melancia e abóbora (BALA; HOSEIN, 1986; NEEDGARD, 1989; SANTOS; CAFÉ FILHO, 2006).

Da mesma forma, foi alta e negativa a correlação entre os valores médios do teste de envelhecimento acelerado e a porcentagem total de fungos associados a cada lote de sementes, com valores de correlação de -0,9648, -0,9483, -0,9644 e -0,9682 para os híbridos Sunrise, Bonus II, Prince Hakucho e Royal Suíte, respectivamente.



**Figura 2.** Correlação entre a germinação das sementes submetidas ao teste de envelhecimento acelerado e fungos associados às sementes dos híbridos Sunrise (A), Bonus II (B), Prince Hakucho (C) e Royal Suíte (D).

Vários trabalhos têm mostrado o alto índice de *D. bryoniae* associado às sementes de meloeiros nobres importadas e comercializadas no Brasil (VERZIGNASSI et al., 2004; GASPAROTTO et al., 2007; GASPAROTTO et al., 2009). Deste modo, é possível que para este patógeno, os resultados deste trabalho possam ser considerados falsos negativos.



#### **4. CONCLUSÕES**

- Os testes de envelhecimento acelerado e de germinação a baixas temperaturas foram os mais adequados para análise de vigor das sementes dos quatro híbridos de meloeiro nobre.
- As sementes do híbrido Bonus II apresentaram maior vigor, seguido dos híbridos Sunrise, Royal Suite e Prince Hakucho.
- Existiu correlação negativa entre ocorrência de patógenos e a qualidade fisiológica para as sementes testadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, R. E. (Org.). **Melão: pós-colheita**. Brasília, DF: EMBRAPA, 2000. 43p. (Frutas do Brasil, 10).
- ARAÚJO, J. P. **Cultura do melão**. Petrolina: EMBRAPA, 1980, 40 p.
- BALA, G.; HOSEIN, F. Studies on gummy stem blight disease of cucurbits in Trinidad. **Tropical Agriculture**, v. 63, p. 195-197, 1986.
- BHERING, M.C.; DIAS, D.C.F.S.; GOMES, J.M.; BARROS, D.I. Métodos para avaliação do vigor de sementes de pepino. **Revista Brasileira de Sementes**, v.22, p.171-175, 2000.
- BHERING, M.C.; DIAS D.C.F.S.; BARROS, D.I.; DIAS, L.A.S.; TOKUHISA, D. Avaliação do vigor de sementes de melancia (*Citrullus lunatus* schrad.) pelo teste de envelhecimento acelerado. **Revista Brasileira de Sementes**, v.25, p.1-6. 2003.
- BHERING, M. C.; DIAS, D. C. F.; TOKUHISA, D.; DIAS, L. A. S. Avaliação do vigor de sementes de melão pelo teste de deterioração controlada. **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, p.125-129, 2004.
- BRANDÃO FILHO, J. U. T.; CALLEGARI, O. Cultivo de hortaliças em solo em ambiente protegido. **Informe agropecuário**, v. 20, p. 64-68, 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de Sementes**/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária – Brasília: Mapa/ACS, 2009a. 399 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária – Brasília: Mapa/ACS, 2009b. 200 p.
- FERREIRA, F. A.; PEDROSA, J. F. Melão: cultivares e métodos culturais. **Informe agropecuário**, v. 8, n. 85, p. 26-28, 1982.
- FERREIRA, D. F. **Sisvar**: Sistema para análise de variância para dados balanceados versão 4.2. Lavras: UFLA, 2003.

GASPAROTTO F. **Avaliação da sanidade de sementes de híbridos de meloeiro nobre indicados para cultivo protegido.** Maringá: UEM, 42p (Tese Mestrado), 2006.

GASPAROTTO, F.; VIDA, J. B.; BONALDO, S. M.; COLELLA, J. C. T.; MARCUZ, F. S. Transmissão de *Didymella bryoniae* por sementes de híbridos de meloeiro nobre. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. S76, 2007.

GASPAROTTO, F.; VIDA, J. B.; TESSMANN, D. J.; BONALDO, S. M.; AGUIAR, R. L.; PENHARBEL, M. P. Eficiência de métodos para detecção de *Didymella bryoniae* associado a sementes de híbridos de meloeiros nobres. **Acta Scientiarum-Agronomy**, v.31, p.397-402, 2009.

MACHADO, J. da C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações.** Brasília: Ministério da Educação, ESAL: FAEPE, 1988. 107p.

MARCOS FILHO J.; CICERO S. M.; SILVA W. R. **Avaliação da qualidade de sementes.** Piracicaba: FEALQ, 320 p., 1987.

MARCOS FILHO J. Pesquisa sobre vigor de sementes de hortaliças. **Informativo ABRATES**, v.11, p.63-75, 2001.

MENTEN, J. O. M. **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico.** São Paulo: Ciba Agro, 1995. 321p.

MUNIZ, M. F. B.; GONÇALVES, N.; GARCIA, D. C.; KULCZYNSKI, S. M. Comparação entre métodos para avaliação da qualidade fisiológica e sanitária de sementes de melão. **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, p.144-149, 2004.

NEERGAARD, E. Studies of *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm: development in the host. **Journal of Phytopathology**, v. 127, p. 107-115, 1989.

NEERGAARD, P. **Seed pathology.** London: Macmillan, 839 p., 1979.

REGO, A. M. Doenças causadas por fungos em Cucurbitáceas. **Informe Agropecuário**, v. 17, p.48-54, 1995.

SANTOS, G. R.; CAFE FILHO, A. C. Ocorrência do crestamento gomoso do caule em melancia no Tocantins causado por *Didymella bryoniae*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 208, 2006.

TORRES, S. B. **Métodos para avaliação do potencial fisiológico de sementes de melão**. Piracicaba: USP-ESALQ, 103p (Tese doutorado), 2002.

VERZIGNASSI, J. R.; VIDA, J. B.; GASPAROTTO, F.; CORTEZ, G. L de S.; LORENZETTI, E. R. Qualidade sanitária de sementes de híbridos comerciais de melão rendilhado utilizados na região norte do Paraná. **Summa Phytopathologica**, v.30, p. S115, 2004.

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.; ZAMBOLIM, L.; COSTA, H.; VALE, F. X. R. Manejo de doenças em 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.

## **CAPITULO II**

### **TRANSMISSÃO DE *Didymella bryoniae* EM MELOEIRO NOBRE: PLANTA – SEMENTE E SEMENTE – PLANTA**

## RESUMO

A podridão gomosa (*Didymella bryoniae*) é a principal doença da cultura de meloeiro nobre (*Cucumis melo* var. *reticulatus*) em ambiente protegido. O patógeno pode ser transmitido por sementes, mas detalhes deste mecanismo ainda precisam ser esclarecidos. Assim, objetivou-se estudar as vias de transmissão de *D. bryoniae* de planta para sementes em cultura de meloeiro nobre e avaliar a transmissão do patógeno de sementes para plantas. Cinco tratamentos foram utilizados para avaliar as vias de transmissão do patógeno da planta para sementes: plantas com flores inoculadas (T1); plantas pulverizadas com a mistura epoxiconazol + piraclostrobina com flores inoculadas (T2); plantas pulverizadas com frutos inoculados (T3); plantas pulverizadas com caule inoculado (T4) e plantas sem inoculação com o patógeno *D. bryoniae* (T5). Para avaliar a associação do patógeno as sementes obtidas dos cinco tratamentos foram utilizados os testes de sanidade em papel filtro e em batata-dextrose-ágar (BDA) utilizando sementes inteiras e divididas. A transmissão do patógeno para plantas foi avaliada através dos testes de sintomas em plantas em substrato comercial, areia e solo:areia em casa-de-vegetação, e em substrato ágar-água e vermiculita em câmara de incubação. No tratamento 3 (frutos inoculados) ocorreu podridão dos frutos e não foram formadas sementes viáveis. O patógeno não foi detectado associado às sementes dos quatro tratamentos pelo teste de sanidade em papel filtro. Já em BDA, ocorreu associação do patógeno a 15%, 4%, 3% e 3% das sementes dos tratamentos T1, T2, T4 e T5, respectivamente. Nos testes de transmissão em casa-de-vegetação, a porcentagem de transmissão de *D. bryoniae* foi de 22,2%; 21,5%; 16,7% e 13,0% para os tratamentos T1, T2, T4 e T5, respectivamente. Nos testes de transmissão em câmara de incubação, a transmissão foi de 17%, 15%, 10% e 8% nos tratamentos T1, T2, T4 e T5, respectivamente. A infecção de sementes de meloeiro nobre por *D. bryoniae* pode ocorrer sistemicamente através da planta ou das flores.

**Palavras-chave:** Podridão gomosa, *Cucumis melo*, via de transmissão, sanidade de sementes.

## ABSTRACT

**Transmission of *Didymella bryoniae* in muskmelon: plant-seeds and seeds-plant.** The gummy stem blight caused by *Didymella bryoniae* is the main disease of culture of muskmelon (*Cucumis melo* var. *reticulatus*) in greenhouse. It is known that the pathogen can be transmitted by seeds, but details of this mechanism remain to be explained. Therefore, the objective was to study the routes of transmission of *D. bryoniae* of the mother plant to seeds of cultivation muskmelons and evaluate the transmission of pathogen from seed to plants. Five treatments were used to evaluate routes of transmission of disease from the mother plant for seeds: plants with inoculated flowers (T1); plants sprayed with the mixture pyraclostrobin + epoxiconazole with inoculated flowers (T2); plants sprayed with inoculated fruits (T3); sprayed at plants with inoculated stem (T4) and plants without inoculation with the pathogen *D. bryoniae* (T5). To evaluate the association of the pathogen the seeds obtained from the five treatments were used sanity tests on filter paper and potato dextrose agar (PDA) using whole seeds and divided. The transmission of disease to plants was evaluated through tests of symptoms in plants in commercial substrate, sand and soil with sand in greenhouse, and water-agar substrate and vermiculite in incubation chamber. In treatment 3 (inoculated fruits) occurred rot of fruits and viable seeds were not formed. Was not possible to detect the pathogen associated with any of the four seed treatments applied by sanity test on filter paper, already in PDA occurred association of the pathogen to 15%; 4%; 3% and 5% of the seeds of T1, T2, T4 and T5, respectively. In tests of transmission in greenhouse, total transmission of *D. bryoniae* seeds to plants was 22,2%; 21,5%; 16,7% and 13,0% of T1, T2, T4 and T5, respectively. And in tests of transmission in an incubation chamber, the percentagen of transmission was 17%, 15%, 10% and 8% of T1, T2, T4 and T5, respectively. These results indicate that infection of muskmelon seeds by *D. bryoniae* can occur for more than one route, systemically by the plant or flower.

**Keywords:** Gummy stem blight, *Cucumis melo*, routes of transmission, sanity of seeds.

## 1. INTRODUÇÃO

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma cultura agrônômica que apresenta grande importância no volume de frutas exportadas pelo Brasil (TAVARES, 2002). Por ser uma cultura com grande demanda de mercado e preços bastante compensadores, esta olerícola tornou-se opção bastante importante para agricultores que empregam o sistema de cultivo em ambiente protegido (BRANDÃO FILHO; VASCONCELLOS, 1998). A produção de meloeiro nobre em ambiente protegido, apesar do sucesso econômico alcançado, tem-se deparado com vários problemas de ordem técnica, os quais têm contribuído para a redução dos lucros do plasticultor. Um dos mais importantes problemas têm sido as doenças incidentes nas culturas na estufa, com frequentes danos significativos, muitas vezes totais (VIDA et al., 1993; VIDA, 1994).

Neste contexto, a podridão gomosa, causada por *Didymella bryoniae* (Auersw) Rehm, anamorfo *Ascochyta cucumis* Fautrey & Roum [= *Phoma cucurbitacearum* (Fr.: Fr.) Sacc.], tem sido a mais importante doença. Danos da ordem de 1,5 a 100% foram observados em culturas de melão nobre conduzidas sob estufa plástica na região de Maringá-PR (VIDA et al., 1993).

O patógeno *D. bryoniae* pode sobreviver em restos de cultura, na forma de micélio dormente, sendo bastante resistente ao dessecamento, podendo servir como fonte de inóculo por mais de um ano (VAN STEEKELEBURG, 1983; SHTIENBERG et al., 2005; KEINATH, 2002; 2008). Este patógeno pode se manter também em sementes infectadas, localizando-se superficialmente ou no interior, no perisperma e tecidos cotiledonares (LEE et al., 1984; SUDISHA et al., 2006). De acordo com os autores, as sementes podem constituir meio de introdução do patógeno nas culturas e com conseqüente desenvolvimento epidêmico da doença.

Devido às formas de sobrevivência que possui, *D. bryoniae* é de difícil controle após seu estabelecimento no campo (VAN STEEKELEBURG, 1985; ARNY; ROWE, 1991; KUROZAWA et al., 2005). Assim, a utilização de medidas excludentes, evitando a entrada do patógeno na área de cultivo, principalmente pela utilização de sementes livres do patógeno, torna-se uma prática importante para a boa sanidade da cultura.



Quando um patógeno está associado a uma semente, ele pode sobreviver por um período maior de tempo, mantendo sua viabilidade e características (MENTEN, 1991). Os mecanismos de infecção de sementes por patógenos têm sido exaustivamente discutidos (NEERGAARD, 1979; AGARWAL; SINCLAIR, 1987), podendo ocorrer de forma sistêmica ou localizada. O inóculo para contaminação das sementes pode originar-se da planta mãe ou de fontes externas, como plantas vizinhas, resíduos culturais de safra anterior ou solo (ZAMBOLIM, 2005).

Assim, este trabalho objetivou estudar as vias de transmissão de *D. bryoniae* da planta mãe para as sementes em cultura de meloeiro nobre Sunrise e avaliar a transmissão do patógeno das sementes produzidas para as plantas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. INFECÇÃO DE MELOEIRO NOBRE POR *D. bryoniae* PARA A INVESTIGAÇÃO DE TRANSMISSÃO DE PLANTA-SEMENTE E SEMENTE-PLANTA

Para instalação da cultura de meloeiro nobre em estufa plástica utilizou-se um lote de sementes do híbrido Sunrise adquirido em estabelecimento de comercialização de sementes em Maringá, PR.

As sementes foram tratadas com o fungicida carbendazim (150g/L) + tiram (350g/L) na dose 0,3+0,7g i.a./kg de sementes e colocadas para pré-germinar entre folhas de papel germitest umedecidas com água destilada à temperatura de 28°C. Após 36 horas em germinador, ocorreu a emissão da radícula e as sementes foram, então, semeadas em bandejas de poliestireno de 128 células contendo substrato comercial Plant Max HF<sup>®</sup>. As bandejas foram mantidas sob condições de casa-de-vegetação semi-climatizada por 28 dias, quando estas foram transplantadas para estufa plástica.

As mudas de melão foram transplantadas para solo em estufa plástica tipo túnel alto coberta com polietileno de alta densidade (150 µm). O espaçamento utilizado foi de 0,30 metros entre plantas e de um metro entre linhas.

O solo foi previamente corrigido com calcário calcítico de acordo com análise prévia elevando-se a saturação de bases (V%) para 80%. Como adubação de base foram utilizados dois litros de composto orgânico bovino, aplicado 30 dias antes do transplante. Um dia antes do transplante, o solo foi adubado com 150g por metro linear do formulado 4-14-8. Após 25 dias do transplante, foi realizada adubação de cobertura com 13g de uréia por metro linear de sulco de plantio.

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, sendo retirados todos os brotos laterais até o 11º entrenó. Nos entrenós 12º, 13º, e 14º as hastes secundárias foram mantidas, onde surgiram as flores/frutos. Nestas hastes foram retirados todos os brotos que surgiram e a poda foi efetuada a uma folha após o fruto. Nos próximos

entrenós do caule continuou-se a retirar todos os brotos até o vigésimo. Nos entrenós 21º, 22º, 23º a haste secundária foi mantida e realizou-se a poda apical da planta. Nestas hastes secundárias, deixou-se crescer uma nova brotação (hastes terciárias), uma folha após o surgimento desta haste terciária realizou-se a poda. Estas três hastes terciárias tiveram crescimento livre. Quando do início do desenvolvimento dos frutos, foram deixadas apenas duas hastes secundárias, com um fruto por haste.

Após a instalação da cultura foram realizadas capinas manuais, quando necessária aplicação dos inseticidas tiametoxam (0,5g i.a./L), imidaclopride (1,2g i.a./L) e dissulfan (1,1g 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 epoxiconazol + piraclostrobina (0,1+0,3g i.a./L) foram iniciadas sete dias após o transplante da mudas e foram realizadas a cada dez dias. Utilizou-se irrigação localizada com o uso de tubo de gotejo em um turno conforme a necessidade da cultura.

O delineamento experimental empregado foi o de blocos ao acaso constituído por cinco tratamentos, seis repetições por tratamento e parcela útil representada por seis plantas por parcela. Os tratamentos foram:

- Tratamento 1 - Plantas com flores inoculadas com *D. bryoniae* sem aplicação de fungicida (T1);
- Tratamento 2 - Plantas pulverizadas a cada dez dias com o fungicida epoxiconazol + piraclostrobina (0,1+0,3g i.a./L) até a abertura das flores e inoculação das flores com *D. bryoniae* (T2);
- Tratamento 3 - Plantas pulverizadas a cada dez dias com o fungicida epoxiconazol + piraclostrobina (0,1+0,3g i.a./L) até o início da formação dos frutos e frutos inoculados com *D. bryoniae* (T3).
- Tratamento 4 - Plantas pulverizadas a cada dez dias com o fungicida epoxiconazol + piraclostrobina (0,1+0,3g i.a./L) até três dias antes a inoculação e caule inoculado com *D. bryoniae* quando do surgimento das flores (T4).

- Tratamento 5 - Plantas sem inoculação e sem pulverização (testemunha) (T5).

A inoculação das flores foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Figueiredo et al. (1970). O inóculo foi produzido em caules de plantas com podridão gomosa apresentando corpos de frutificação tanto da fase assexual (picnídios com conídios) quanto da fase sexual (pseudotécios contendo ascas e ascósporos). Os caules com lesões foram triturados com água destilada e a suspensão obtida filtrada em gaze. Após a filtração, a concentração da mesma foi ajustada para  $10^{-2}$  esporos/mL. Foram selecionadas quatro flores em cada haste secundária e, quando ocorreu a abertura das mesmas, estas foram inoculadas com duas gotas da suspensão com esporos de *D. bryoniae* e foram mantidas em câmara úmida por 24 horas.

Para a inoculação de frutos e caules, o isolado de *D. bryoniae* empregado foi obtido no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Maringá, sendo proveniente de lesões em plantas de melão nobre com sintomatologia de podridão gomosa. Este foi mantido em meio de batata-dextrose-ágar em câmara de incubação à temperatura de 24 °C e 12 horas de fotoperíodo por 15 dias.

A inoculação dos frutos com *D. bryoniae* foi realizada quando estes estavam com diâmetro aproximado de 8,0 cm utilizando-se o método do palito (Verzignassi et al., 2004). Discos de micélio de 0,5 cm de diâmetro do meio de cultivo BDA contendo micélio de *D. bryoniae* foram retirados das bordas das colônias para serem utilizados para a inoculação. Procedeu-se a abertura de um orifício por fruto, de 0,5 cm de diâmetro, com o auxílio de perfurador. Meio palito de dente esterilizado, contendo o disco de cultura, foi inserido no fruto. Após a inoculação, os frutos foram envolvidos por um saco plástico umedecido e mantidos em câmara úmida por 48 horas. Para evitar possível contaminação das flores antes da formação dos frutos, estas foram protegidas com saco de papel até o início da formação dos mesmos.

A inoculação no caule das plantas também foi realizada utilizando-se o método de Verzignassi et al. (2004), do mesmo modo como descrito acima. A

inoculação foi realizada logo após o surgimento das flores nas hastes secundárias e estas foram protegidas por sacos de papel.

Os frutos produzidos em cada tratamento foram coletados quando entraram em estágio de maturação fisiológica. Realizou-se, então, a retirada das sementes dos frutos, lavagem e secagem das mesmas à sombra.

Em cada tratamento as sementes produzidas foram avaliadas quanto à associação com o patógeno *D. bryoniae* e quanto à transmissão deste para plântulas.

## **2.2. TRANSMISSÃO DE *Didymella bryoniae* PLANTA-SEMENTES**

Para a investigação da transmissão do patógeno das plantas dos cinco tratamentos para as sementes produzidas foram utilizados os testes de sanidade em papel filtro e em BDA, com sementes inteiras e com sementes divididas.

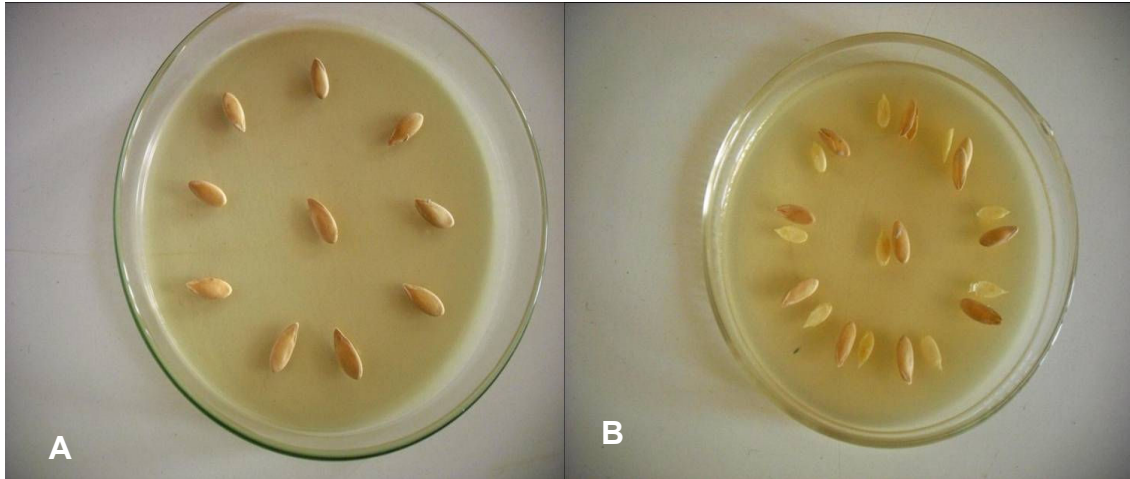
O teste em papel filtro com sementes inteiras foi realizado conforme metodologia descrita por Neergaard (1979) e indicado por Brasil (2009b). Foram avaliadas 400 sementes por tratamento, distribuídas em oito repetições de 50 sementes. As sementes foram colocadas em gerbox contendo três folhas de papel filtro umedecidas com água destilada esterilizada. Os gerbox contendo as sementes foram colocados aleatoriamente em câmara de incubação com temperatura de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , por 24 horas, sob regime de luminosidade de 12 horas de luz negra (NUV de 320 a 420nm) e 12 horas de escuro. Após este período, as sementes foram transferidas para freezer a  $-20^\circ\text{C}$ , por 24 horas. Em seguida, o material foi incubado novamente a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , sob o regime de luminosidade descrito, por cinco dias. Após o período de incubação, cada semente foi examinada sob microscópio estereoscópico. Para as sementes nas quais se observou a presença de quaisquer estruturas fúngicas, prepararam-se lâminas, as quais foram observadas ao microscópio óptico com a finalidade de identificação do fungo associado às sementes, por meio da morfologia das estruturas presentes. Os resultados foram expressos em percentual de sementes com *D. bryoniae* associada.

O teste em papel filtro com sementes divididas foi realizado conforme metodologia descrita por Lee et al. (1984). Foram avaliadas 400 sementes por tratamento, distribuídas em oito repetições de 50 sementes cada. Inicialmente, as sementes foram lavadas individualmente cinco vezes com água destilada esterilizada e, na sequência, embebidas por duas horas em água destilada esterilizada. Após este período, as sementes foram dissecadas assepticamente com uma lâmina descartável desinfestada, separando-se em duas partes: casca e perisperma mais embrião. Os componentes de cada semente foram plaqueados em gerbox, contendo três folhas de papel filtro esterilizadas e umedecidas com água destilada e o material foi incubado e avaliado de acordo com o descrito para sementes inteiras. Os resultados foram expressos em percentual de sementes com *D. bryoniae* associada a cada parte das sementes.

O teste em batata-dextrose-ágar (BDA) para sementes inteiras foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Sudisha et al. (2006). Sementes oriundas de cada tratamento foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio (2%) durante cinco minutos e lavadas, por três vezes, com água destilada esterilizada. Em seguida, as sementes foram distribuídas em placas contendo o meio de cultura BDA (Figura 1). As placas contendo as sementes foram distribuídas, aleatoriamente, em câmara de incubação com temperatura de  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sob regime de luminosidade alternada de 12/12 horas de (NUV de 320 a 420nm) e escuro, durante sete dias. Para as sementes em que se observou a presença de quaisquer estruturas fúngicas, foram preparadas lâminas de microscopia que foram observadas em microscópio óptico com a finalidade de identificação do fungo associado. Para cada tratamento testado, foram utilizadas 400 sementes, ou seja, oito repetições de 50 sementes, cada repetição composta por quatro placas. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes com *D. bryoniae* associado.

Para o teste em BDA com sementes divididas, as sementes foram dissecadas conforme descrito para o teste em papel filtro. Os componentes de cada semente foram plaqueados no meio de cultivo e incubados nas condições descritas para o teste em BDA para sementes inteiras (Figura 1). Para cada tratamento foram utilizadas 400 sementes, ou seja, oito repetições

de 50 sementes, cada repetição composta por quatro placas. Os resultados foram expressos em porcentagem de partes de sementes com *D. bryoniae* associada.



**Figura 1.** Teste de sanidade em meio de cultivo batata-dextrose-ágar com sementes inteiras (A) e sementes divididas em casca e perisperma + embrião (B).

### **2.3. TRANSMISSÃO DE *Didymella bryoniae* SEMENTES-PLANTAS**

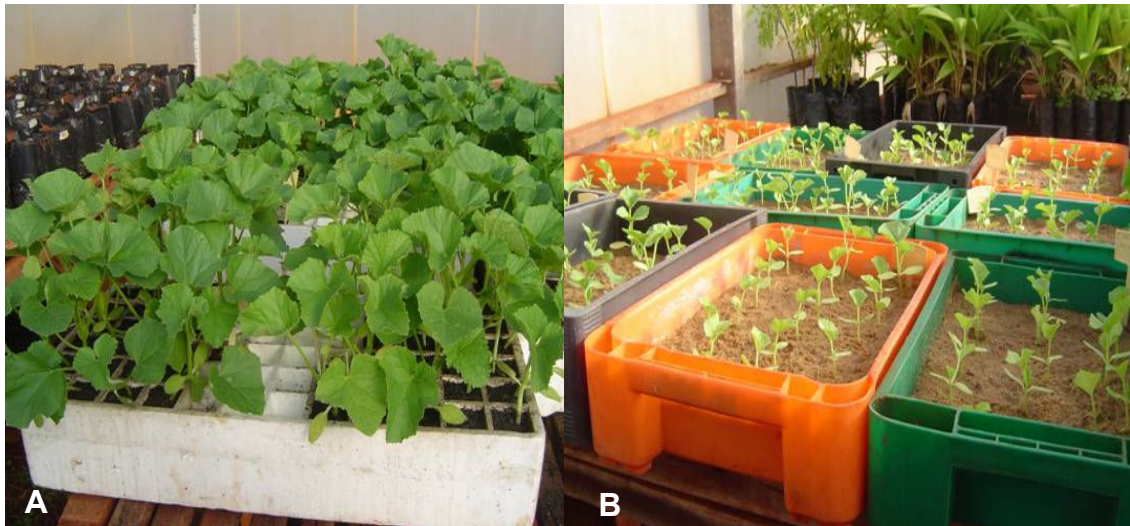
A avaliação da transmissão do patógeno das sementes produzidas nos cinco tratamentos (item 2.1) para as plantas foi realizada em casa-de-vegetação (teste de transmissão nos substratos comercial, areia lavada e solo:areia) e em câmara de incubação (teste de transmissão em ágar-água e em vermiculita).

No teste de transmissão em plantas em substrato comercial seguiu-se a metodologia descrita por Gasparotto et al. (2009). Utilizou-se o substrato comercial Plant Max HF<sup>®</sup>, 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 o semeio das sementes oriundas de cada tratamento. As bandejas foram mantidas em casa-de-vegetação semi-climatizada. Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento do item 2.1 (Figura 2).

Para o teste de transmissão no substrato areia lavada foi utilizada a metodologia descrita por Neergaard (1979). A areia foi autoclavada, seguida de período de repouso como descrito anteriormente. Em seguida a areia foi distribuída em caixas plásticas (40 x 28 x 10cm) e realizou-se a semeadura das sementes. As caixas foram mantidas em casa-de-vegetação semi-climatizada. Para cada híbrido, foram utilizadas 200 sementes de cada tratamento (item 2.1) distribuídas em quatro repetições de 50 sementes (Figura 2).

Seguindo a metodologia descrita por Gasparotto et al. (2009), após 30 dias da semeadura, metade das plantas de cada tratamento no substrato areia lavada foi transferida para sacos contendo 350mL do substrato solo mais areia na proporção 2:1 v/v, desinfestado através de autoclavagem.

Na transferência para o novo substrato, as plantas foram retiradas de forma alternada nas fileiras das caixas plásticas. Tanto as plantas que permaneceram nas caixas, quanto as que foram transferidas para o substrato solo-areia, foram mantidas em casa-de-vegetação semi-climatizada. As irrigações foram realizadas, diariamente, com água de torneira.



**Figura 2.** Plantas em substrato comercial (A) e em substrato areia lavada (B) em casa-de-vegetação semi-climatizada.

Após a emergência, todas as plântulas de ambos os substratos foram examinadas, diariamente, quanto à presença de sintomatologia de podridão gomosa (sintomas da doença e sinais do patógeno). As plântulas com sintomas



foram descartadas. Esse procedimento foi adotado para evitar disseminação de inóculo de plantas doentes para plantas saudáveis.

As avaliações foram realizadas durante 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 três substratos.

Após os 60 dias do período experimental em casa-de-vegetação as plantas assintomáticas em cada substrato foram coletadas separando-se as folhas do caule. O caule foi lavado em água destilada e mantido em câmara úmida por 72 horas. Após este período, os caules foram avaliados quanto à presença de sinais do patógeno e os resultados expressos em porcentagem de plantas com podridão gomosa.

Para o teste de transmissão em plantas em ágar-água tubos de ensaio de 18x180mm contendo meio ágar-água (10%) foram utilizados. Duzentas sementes de cada tratamento (item 2.1) foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio (2%) durante cinco minutos e lavadas por três vezes com água destilada esterilizada. Adicionou-se uma semente em cada tubo de ensaio, totalizando quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento. As sementes nos tubos de ensaio foram incubadas por 45 dias sob ciclos alternos de 12 horas de luz negra (NUV de 320 a 420nm) e 12 horas de escuro, à temperatura de  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . As plantas foram avaliadas a cada cinco dias durante 40 dias quanto à ocorrência de quaisquer sintomas de podridão gomosa. Os resultados foram expressos em porcentagem de plantas com sintomas de podridão gomosa.

Para o teste de sintomas em plantas em vermiculita, efetuou-se a lavagem do substrato, a retirada das impurezas e o acondicionamento em tubos de ensaio de 18x180mm, seguida da autoclavagem dos tubos. Duzentas sementes de cada tratamento foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio (2%, por cinco minutos) e lavadas por três vezes com água destilada esterilizada. Em seguida, procedeu-se a transferência de uma semente para cada tubo de ensaio. Os tubos foram mantidos em câmara de incubação por 40 dias, sob ciclos alternados de 12 horas luz fluorescente e 12 horas de escuro à temperatura de  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . As plantas foram avaliadas a cada

cinco dias quanto à presença de quaisquer sintomas de podridão gomosa. Os resultados foram expressos em porcentagem de plantas apresentando sintomas de podridão gomosa.

#### **2.4. ANÁLISE DOS RESULTADOS**

Os resultados obtidos nos testes de sanidade e transmissão foram submetidos à análise de variância e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott através do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2003).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. TRANSMISSÃO DE *Didymella bryoniae* PLANTA-SEMENTES

As plantas dos tratamentos T1 (plantas com flores inoculadas), T2 (plantas pulverizadas com a mistura epoxiconazol + piraclostrobina com flores inoculadas), T4 (plantas pulverizadas com caules inoculados); T5 (plantas sem inoculação) produziram frutos comercializáveis, sendo possível a retirada das sementes e as avaliações de transmissão de *D. bryoniae* de planta mãe para sementes e de sementes para plantas. Já, no tratamento T3, constituído por plantas onde se realizou a inoculação de frutos não foi possível realizar estas avaliações, pois ocorreu podridão dos frutos dez dias após a inoculação com *D. bryoniae*.

No teste de sanidade de sementes empregando o método de papel filtro com sementes inteiras e sementes divididas de meloeiro nobre, não foi constatada a presença de quaisquer estruturas de *D. bryoniae* em nenhum dos tratamentos avaliados (Quadro 1).

**Quadro 1.** Porcentagem de sementes de meloeiro nobre (*Cucumis melo* var, *reticulatus*) híbrido Sunrise com *Didymella bryoniae* associada por meio dos testes de sanidade em papel filtro e em meio de cultivo batata-dextrose-ágar (BDA).

Trat <sup>1</sup>	Teste em papel filtro			Teste em BDA			Total (%) <sup>2</sup>
	Sementes Inteiras (%)	Sementes divididas (%)		Sementes Inteiras (%)	Sementes divididas (%)		
		Casca	Perisperma + embrião		Casca	Perisperma + embrião	
1	0	0	0	9	6	6	15a <sup>3</sup>
2	0	0	0	2	2	2	4b
3	-	-	-	-	-	-	-
4	0	0	0	1	1	1	3b
5	0	0	0	1	1	1	3b

<sup>1</sup>Tratamentos: 1- Plantas com flores inoculadas sem tratamento fungicida; 2- Plantas com flores inoculadas e pulverizadas com fungicida; 3- Plantas com frutos inoculados e pulverizadas com fungicida; 4- Plantas com caule inoculado e pulverizadas com fungicida; 5- Plantas sem inoculação (testemunha).

<sup>2</sup>Porcentagem do total de sementes utilizadas no teste em BDA com *D. bryoniae* associado considerando sementes inteiras e divididas.

<sup>3</sup>Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, pertencem ao mesmo agrupamento pelo teste de Scott-knott, em nível de 5% de probabilidade.

Nos ensaios em BDA, tanto com sementes inteiras quanto com sementes divididas, foi constatada a associação do patógeno às mesmas. A frequência de associação do patógeno as sementes inteiras foi de 9%, 2%, 1% e 1% para sementes obtidas dos tratamentos T1, T2, T4 e T5, respectivamente, e a frequência de associação do patógeno no teste com sementes divididas foi de 6%, 2%, 1% e 1% para sementes dos tratamentos T1, T2, T4 e T5, respectivamente. Em todas as sementes divididas em que se constatou o patógeno associado, este estava localizado tanto na casca quanto no perisperma mais embrião.

Considerando o total de sementes utilizadas nos teste de sanidade em BDA com sementes inteiras e divididas a porcentagem total de associação de *D. bryoniae* com as sementes foi de 15%, 4%, 3% e 3% para os tratamentos T1, T2, T4 e T3. Entre os tratamentos, o T1 (plantas com flores inoculadas sem tratamento fungicida) foi o que apresentou maior percentual de sementes infectadas por *D. bryoniae* no teste de sanidade em BDA.

O resultado do teste de sanidade em papel filtro mostrou-se como falso negativo, pois *D. bryoniae* estava associada às sementes dos tratamentos T1, T2, T4 e T5, o que pôde ser constatado no teste de sanidade em BDA. Gasparotto et al. (2009), avaliando lotes de sementes de três híbridos de meloeiro nobre, também relataram a ocorrência de falso negativo no teste de sanidade em papel filtro para o patógeno *D. bryoniae*.

A associação do patógeno às sementes dos quatro tratamentos foi relativamente baixa, comparada com trabalhos desenvolvidos com meloeiro. Lee et al. (1984) utilizando o teste com ágar sólido obtiveram índice de *D. bryoniae* mais alto, 19%. Em meio batata-dextrose-ágar, Sudisha et al. (2006), obtiveram índice de 31% de *D. bryoniae* associado às sementes de melão.

### **3.2. TRANSMISSÃO DE *Didymella bryoniae* SEMENTES-PLANTAS**

Nos três testes desenvolvidos em casa-de-vegetação: transmissão em substrato comercial Plant Max HF<sup>®</sup>, areia lavada e solo:areia foi possível constatar a transmissão de *D. bryoniae* pelas sementes produzidas nos quatro tratamentos para plantas de meloeiro nobre.

As porcentagens de transmissão de *D. bryoniae* foram de 18,5%; 10,5%; 8% e 4,5% para os tratamentos T1, T2, T4 e T5, respectivamente, nas plantas mantidas durante sessenta dias em substrato comercial (Quadro 2). As plantas assintomáticas, coletadas aos 60 dias neste substrato, e submetidas à câmara úmida apresentaram porcentagem de associação de 21,5%; 18%; 10% e 10% para os tratamentos T2, T4, T1 e T5, respectivamente. Totalizando assim porcentagens de 32%; 28,5%; 26% e 14,5% de plantas com associação do patógeno nos tratamentos T2, T1, T4 e T5, respectivamente.

**Quadro 2.** Transmissão de *Didymella bryoniae* por sementes de melão nobre (*Cucumis melo* var. *reticulatus*) híbrido Sunrise em substrato Plant Max HF<sup>®</sup>, areia lavada e solo-areia.

Trat. <sup>1</sup>	Plant Max HF			Areia			Solo:Areia		
	C.V. <sup>2</sup> (%)	C.U. <sup>3</sup> (%)	Total <sup>4</sup> (%)	C.V. (%)	C.U. (%)	Total (%)	C.V. (%)	C.U. (%)	Total (%)
1	18,5	10,0	28,5a	5,5	14,5	20,0a	2,5	16,0	18,5 <sup>a</sup>
2	10,5	21,5	32,0a	6,0	9,0	15,0b	3,0	14,5	17,5 <sup>a</sup>
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	8,0	18,0	26,0a	3,5	8,5	12,0c	1,0	11,0	12,0b
5	4,5	8,0	12,5b	3,5	9,0	12,5c	2,0	10,0	12,0b
<b>CV</b>			19,16%			10,72%			10,07%

<sup>1</sup>Tratamentos: 1- Plantas com flores inoculadas sem tratamento fungicida; 2- Plantas com flores inoculadas e pulverizadas com fungicida; 3- Plantas com frutos inoculados e pulverizadas com fungicida; 4- Plantas com caule inoculado e pulverizadas com fungicida; 5- Plantas sem inoculação (testemunha) e sem pulverização com fungicida.

<sup>2</sup>C.V. – Porcentagem de plantas sintomáticas, em casa-de-vegetação.

<sup>3</sup>C.U. – Porcentagem de plantas com corpos de frutificação do patógeno, em câmara úmida.

<sup>4</sup>Total – Porcentagem total de plantas com o patógeno associado em casa-de-vegetação e câmara úmida.

<sup>5</sup>Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, pertencem ao mesmo agrupamento pelo teste de Scott-knott, em nível de 5% de probabilidade.

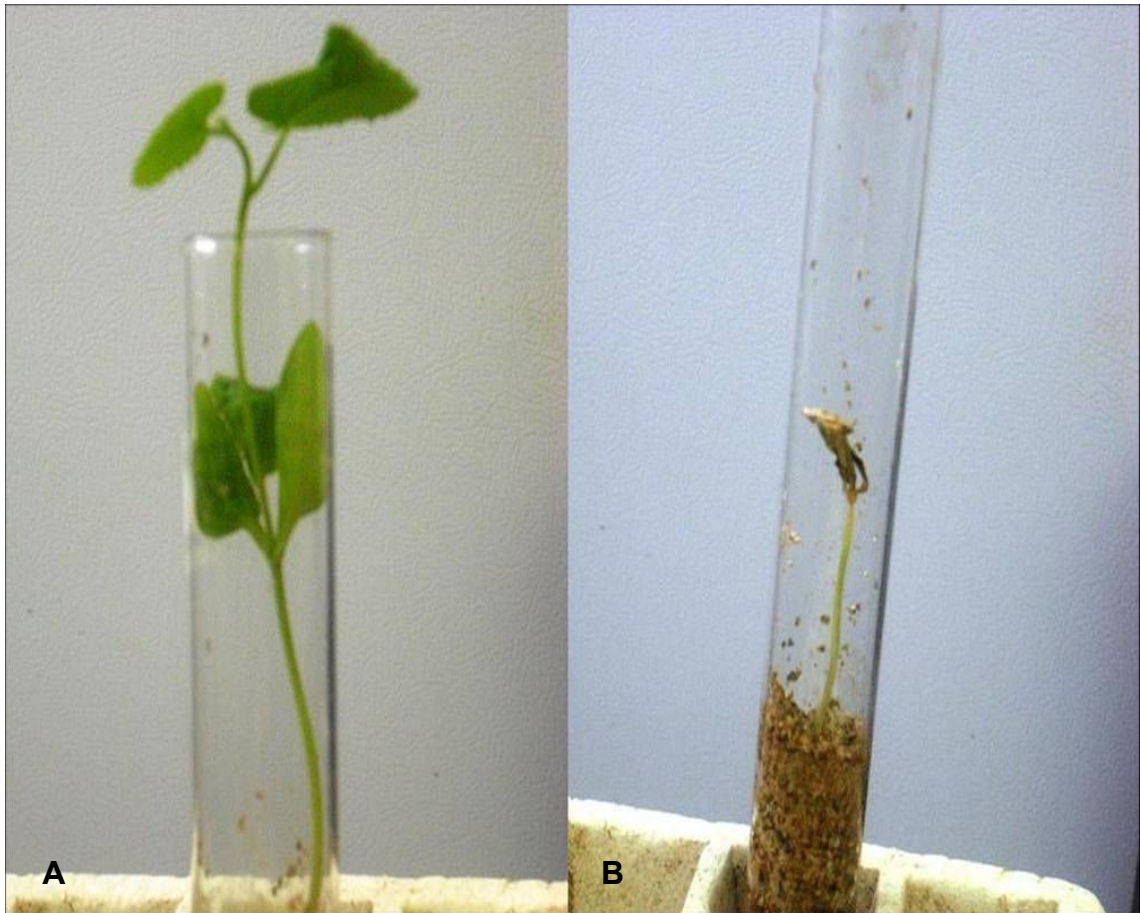
Em substrato areia, a transmissão de *D. bryoniae* foi de 6%; 5,5%; 3,5% e 3,5% para os tratamentos T2, T1, T4 e T5, respectivamente. Após a câmara úmida, a porcentagem de transmissão foi de 14,5%; 9%; 9% e 8,5%, para os tratamentos T1, T2, T5 e T4, respectivamente. Considerando todas as plantas que apresentaram sintomatologia de podridão gomosa e sinais de *D. bryoniae* nas duas etapas, a porcentagem final de transmissão neste teste foi

de 20%; 15%; 12% e 12,5% para os tratamentos T1, T2, T4 e T5, respectivamente.

Já para as plantas que foram mantidas durante 30 dias em areia e depois foram transplantadas para solo:areia e permaneceram neste substrato por mais 30 dias, a porcentagem de transmissão foi de 3%; 2,5%; 2% e 1% para os tratamentos T2, T1, T5 e T4, respectivamente. Os sintomas só foram observados após o transplante para solo-areia. Após a permanência em câmara úmida a porcentagem de associação de *D. bryoniae* com as plantas foi de 16%; 14,5%; 11% e 10% para os tratamentos T1, T2, T4 e T5, respectivamente. Considerando todas as plantas com incidência de podridão gomosa, a porcentagem final de transmissão neste substrato foi de 18,5%; 17,5%; 12,0% e 12,0% para os tratamentos T1, T2, T4 e T5, respectivamente.

Nas plantas produzidas a partir das sementes dos quatro tratamentos e nos três substratos utilizados os primeiros sintomas de podridão gomosa ocorreram aos 32 dias da emergência. O início dos sintomas correspondeu com a época em que as folhas cotiledonares começaram a senescer. Os sintomas iniciaram-se no caule, próximo às folhas cotiledonares senescentes, como lesões inicialmente aquosas e que, posteriormente, se tornaram necróticas, com coloração palha clara. Observou-se que as lesões cresciam longitudinalmente e transversalmente e, em muitas plantas, ocorria o fendilhamento do caule. Também foi constatada a ocorrência de exsudação de goma e, nos tecidos com sintomas mais velhos ocorreu à formação de numerosos corpos de frutificação negros (picnídios com conídios e pseudotécios com ascas e ascósporos). A sintomatologia observada foi típica de podridão gomosa em cucurbitáceas relatada por WIANZ (1945), CHIU; WALKER (1949), KUROSZAWA et al. (2005) e SUDISHA et al. (2006).

Nos testes efetuados em câmara de incubação em substrato ágar-água e vermiculita ocorreu a transmissão de *D. bryoniae* para plantas dos quatro tratamentos avaliados. Os sintomas foram semelhantes aos que ocorreram em casa-de-vegetação (Figura 3).



**Figura 3.** Planta de meloeiro nobre sadia (A) e planta de meloeiro nobre com sintomas de podridão gomosa (B) no teste de sintomas em plantas em substrato vermiculita.

No substrato ágar-água, a transmissão de *D. bryoniae* das sementes para plantas foram de 3%; 3%; 2% e 2% nos tratamentos T1, T2, T4 e T5, respectivamente (Quadro 3). Já, no teste de transmissão no substrato vermiculita, a transmissão foi de 14%; 12%; 8% e 6% para os tratamentos T1, T2, T4 e T5, respectivamente. Considerando o total de sementes utilizadas nos dois testes e a porcentagem de plantas com sintomatologia de podridão gomosa, a porcentagem total de transmissão foi de 17%; 15%; 10% e 8% para os tratamentos T1, T2, T4 e T5, respectivamente. Da mesma forma que nos testes em casa-de-vegetação, nestes testes os tratamentos com maior transmissão de podridão gomosa foram os tratamentos T1 e T2, onde foi realizada a inoculação das flores, diferindo dos demais ao nível de 5% pelo teste de Scott-Knott.

**Quadro 3.** Transmissão de *Didymella bryoniae* (%) por sementes para plantas de meloeiro nobre híbrido Sunrise nos substratos ágar-água e vermiculita em câmara de incubação.

Tratamentos <sup>1</sup>	Ágar-água (%)	Vermiculita (%)	Total (%) <sup>2</sup>
1	3,0	14,0	17,0 a <sup>3</sup>
2	3,0	12,0	15,0 a
3	-	-	
4	2,0	8,0	10,0 b
5	2,0	6,0	8,0 b

<sup>1</sup>Tratamentos: 1- Plantas com flores inoculadas sem tratamento fungicida; 2- Plantas com flores inoculadas e pulverizadas com fungicida; 3- Plantas com frutos inoculados e pulverizadas com fungicida; 4- Plantas com caule inoculado e pulverizadas com fungicida; 5- Plantas sem inoculação (testemunha) e sem pulverização com fungicida.

<sup>2</sup>Total – Porcentagem de plantas com o patógeno associado considerando 400 sementes utilizadas para os testes em ágar-água e vermiculita.

<sup>3</sup>Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, pertencem ao mesmo agrupamento pelo teste de Scott-knott, em nível de 5% de probabilidade.

Observando os resultados obtidos neste trabalho nota-se que o patógeno *D. bryoniae* não foi detectado associado às sementes dos quatro tratamentos pelo teste em papel filtro e no teste de sanidade em meio de cultivo BDA o índice de sementes com o patógeno associado foi bem menor do que o índice de transmissão do patógeno para plantas (Quadros 1, 2 e 3). Isso mostra que os testes de sanidade em papel filtro e BDA são menos sensíveis para avaliar a qualidade sanitária de sementes de meloeiro nobre quanto à *D. bryoniae*, resultando em falsos negativos. Em análise sanitária de lotes de sementes, o percentual encontrado nos testes de transmissão para plantas geralmente é menor que a porcentagem encontrada do patógeno associado às sementes pelos testes de sanidade (MENTEN, 1991). A inadequação do teste de sanidade em papel filtro já havia sido apontada anteriormente para três lotes de sementes de meloeiro nobre (GASPAROTTO et al., 2009).

No teste de sanidade em meio de cultivo BDA e, para todos os tratamentos, foi constatada a presença de *D. bryoniae*, tanto na casca quanto no perisperma mais embrião das sementes. Resultados semelhantes foram obtidos por Lee et al. (1984) e Sudisha (2006), que detectaram o patógeno infectando casca, perisperma e embrião de sementes de cucurbitáceas, sendo a maior porcentagem de associação encontrada na casca e perisperma.



Os tratamentos nos quais ocorreu maior associação do patógeno com as sementes, considerando os testes de sanidade e os de transmissão, foram T1 e T2, casos em que houve a inoculação do patógeno diretamente nas flores, mostrando que as sementes foram infectadas pelo patógeno através das flores sem causar qualquer sintoma nos frutos produzidos. O tratamento T4 (plantas pulverizadas com caule inoculado) apresentou valores intermediários de infecção, evidenciando que o patógeno pode ter sido levado sistemicamente até as sementes. De acordo com os resultados, neste tratamento, a quantidade de inóculo de *D. bryoniae* que chegou às sementes foi menor do que com a inoculação direta das flores (T1 e T2).

O tratamento com menor porcentagem de sementes com *D. bryoniae* associado foi o tratamento 5 (sem inoculação). Neste tratamento, algumas plantas apresentaram sintomatologia de podridão gomosa espontaneamente no caule a partir de inóculo advindo de plantas vizinhas e ou sementes. A infecção das sementes desse tratamento pode ter ocorrido sistematicamente através da planta mãe, como ocorreu no tratamento em que se inoculou o caule das plantas, ou sistemicamente pelas flores, já que estas não foram protegidas antes da formação dos frutos e esporos do patógeno podem ter chegado até as mesmas.

A infecção sistêmica de sementes ocorre quando o patógeno coloniza sistemicamente pelo sistema vascular, pela flor, pelo pedicelo, pedúnculo ou funículo. A infecção de sementes via estigmas pode ser classificada também como sistêmica, uma vez que o patógeno chega até a semente através de colonização sistêmica de estigmas, seguindo o caminho do pólen (NEEGAARD, 1979; SOAVE; WETZEL, 1987; ZAMBOLIM, 2005).

Alguns patógenos não afetam a semente ou a emissão das plântulas, mas infectam a semente sistemicamente, com redução do seu vigor (DHINGRA et al., 1980). O patógeno *D. bryoniae*, diante dos resultados apresentados neste trabalho, comporta-se desta mesma forma, infectando as sementes sistemicamente sem causar danos nos frutos, nas sementes, na emissão das plântulas e manifestando sintomas quando as plantas estão adultas.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que *D. bryoniae* pode infectar sementes via sistêmica com inoculação em flores ou caule de plantas

de melão Sunrise. Demonstrando que a infecção de sementes de meloeiro nobre Sunrise por *D. bryoniae* pode ocorrer por mais de uma rota, sistemicamente através da planta mãe ou através da flor. Assim, em culturas de meloeiro, o inóculo pode chegar às sementes diretamente pela planta mãe ou a partir de fontes externas, como plantas vizinhas, resíduos culturais de safra anterior, ou solo.

Diante destes fatos, faz-se necessário ressaltar a importância da utilização de sementes sadias e, também, do tratamento de sementes. Sementes produzidas em plantas assintomáticas podem estar infectadas pelo patógeno *D. bryoniae* que, por sua vez, pode ser transmitido para mudas no campo.

#### 4. CONCLUSÕES

- *Didymella bryoniae* causou infecção nas sementes através da inoculação de flores e caule de plantas de meloeiro nobre.
- O patógeno foi transmitido para sementes, porém não causou sintomas nos frutos.
- A infecção de sementes de meloeiro nobre por *D. bryoniae* ocorreu por mais de uma rota, sistemicamente pela planta e flores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, V. K.; SINCLAIR, J. B. **Principles of seed pathology**. Boca Raton: CRC Press, 1987. 168p.

ARNY, C.J.; ROWE, R.C. Effects of temperature and duration of surface witness on spore production and infection of cucumbers by *Didymella bryoniae*. **Phytopathology**, v. 81, p. 206-209, 1991.

BRANDÃO FILHO, J. U. T, VASCONCELLOS, M. A. S. A cultura do meloeiro. In: GOTO, R., TIVELLI, S. W. **Produção de hortaliças em ambiente protegido: condições subtropicais**. São Paulo: Fundação Editora da UNESP, 1998, p.161- 194.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de Sementes**/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária – Brasília:Mapa/ACS, 2009. 399 p.

CHIU, W. F.; WALKER, J. C. Morphology and variability of the cucurbit black rot fungus. **Journal of Agricultural Research**, v. 78, p. 81-102, 1949.

DHINGRA, O. D.; MUCHOVEJ, J. J.; CRUZ FILHO, J. **Tratamento de sementes (controle de patógenos)**. Viçosa: Imprensa universitária da Universidade Federal de Viçosa, 1980, 121p.

FERREIRA, D. F. **Sisvar**: Sistema para análise de variância para dados balanceados versão 4.2. Lavras: UFLA, 2003.

FIGUEIREDO, M. B.; CARDOSO, R. M. G.; HARRUDA H. V. Blossom excision as a method of controlling fruit rot infection caused by *Mycosphaerella melonis* (Pass.) Chiu and J. C. Walker in Italian squash (*Cucurbita pepo* L.). **Arquivo Instituto Biológico**, v. 37, p. 285-292, 1970.

GASPAROTTO, F; VIDA, J. B.; TESSMANN, D. J.; BONALDO, S. M.; AGUIAR, R. L.; PENHARBEL, M. P. Eficiência de métodos para detecção de *Didymella bryoniae* associado a sementes de híbridos de meloeiros nobres. **Acta Scientiarum-Agronomy**, v.31, p.397-402, 2009.

KEINATH, A. P. Survival of *Didymella bryoniae* in buried watermelon vines in South Carolina. **Plant Disease**, v. 86, p. 32-38, 2002.

KEINATH, A. P. Survival of *Didymella bryoniae* in infested muskmelon crowns in South Carolina. **Plant Disease**, v. 92, p. 1223-1228, 2008

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A., REZENDE, J. A. M.. Doenças das cucurbitáceas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**, 2, 4ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p.293-302, 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: FEALQ, p.115-136, 1991.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. v.1. London: Macmillan, 1979. 839p.

SHTIENBERG, D., GAMLIEL-ATINSKY, E., RETIG, B., BRENER, S., AND 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.

SOAVE, J.; WETZEL, M. M. V. S (Ed). **Patologia de sementes**. Campinas, Fundação Cargill, 1987, 480p.

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.

TAVARES, S. C. C. de H. **Melão, Fitossanidade: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 87 p. (Frutas do Brasil; 25).

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.

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**, Netherlands, v.91, p.253-264, 1985.

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 (S), p.324, 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.

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 "japonês". **Fitopatologia Brasileira**, v.29 (S), p.154, 2004.

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

ZAMBOLIM, L. **Sementes - Qualidade Fitossanitária**. 1. ed. Viçosa: Departamento de Fitopatologia, 2005. v. 1. 502 p.

### **CAPÍTULO III**

#### **DETECÇÃO DE *Didymella bryoniae* EM SEMENTES DE MELOEIRO POR PCR MULTIPLEX**

## RESUMO

O patógeno *Didymella bryoniae* é o agente causal da podridão gomosa, importante doença em cultivo de meloeiro nobre em ambiente protegido. Este patógeno é transmitido naturalmente por sementes e a sua detecção em sementes é difícil ou demorada pelos métodos disponíveis na literatura resultando em falsos negativos. Diante da necessidade de um método rápido e sensível para a investigação deste patógeno associado às sementes, este trabalho teve como objetivo desenvolver um método de detecção de *D. bryoniae* em sementes de meloeiro nobre por PCR. Para isso, avaliaram-se três protocolos de extração de DNA (SDS, CTAB e Guanidina) com três quantidades de sementes (50, 100 e 200 sementes) e sementes em três condições (sem embebição, embebidas por 24 horas, embebidas por 48 horas). Empregou-se um protocolo de PCR multiplex com oligonucleotídeos específicos para *D. bryoniae* anteriormente desenvolvido para detecção deste patógeno em caules sintomáticos de cucurbitáceas. Os protocolos baseados no detergente SDS e no detergente CTAB funcionaram com sucesso na extração do DNA de lotes de sementes. A quantidade de sementes utilizadas para a extração de DNA não alterou a detecção do patógeno nas amostras extraídas pelo protocolo com SDS, porém, para o protocolo com CTAB, quanto menor quantidade de semente utilizada, mais difícil foi a detecção. A embebição prévia das sementes influenciou de forma negativa na extração de DNA. A detecção qualitativa do patógeno *D. bryoniae* associado a sementes de meloeiro nobre através da técnica de PCR multiplex permitiu a detecção do patógeno em lotes de sementes com 4% a 46% de associação.

**Palavras-chave:** Meloeiro nobre, podridão gomosa, sanidade de sementes, detecção molecular.



## ABSTRACT

**Detection of *Didymella bryoniae* in seeds of melon by multiplex PCR.** The pathogen *Didymella bryoniae* is the causal agent of gummy stem blight, an important disease in muskmelon cultivation in greenhouse. This pathogen is naturally transmitted by seeds and its detection is difficult and slow by the methods usually used. Faced with the need for a rapid and sensitive method to detect this pathogen in seeds, this study had the objective to evaluate methods of DNA extraction and sample size of muskmelon seeds, to develop a method of detection of *D. bryoniae* in seeds by multiplex PCR using primers previously developed for detecting the pathogen in stems of cucurbits. For this purpose, was evaluated three protocols of DNA extraction (SDS, CTAB and Guanidine), three quantities of seed (50, 100 and 200 seeds) and seeds in three conditions (no soaking, soaked for 24 hours, soaked for 48 hours). It was applied a protocol with multiplex PCR with primers specific for *D. bryoniae* previously developed for detecting the pathogen in stems of symptomatic cucurbits. The protocols based in the detergent SDS and CTAB worked successfully in the extraction of DNA from melon seeds. The quantity of seeds used for extraction of DNA did not alter the detection of the pathogen in samples extracted by the protocol with SDS, but for the CTAB protocol with the smaller amount of seed used less detection. The preliminary soaking seeds were negatively influenced in the extraction of DNA. Qualitative detection of the pathogen *D. bryoniae* associated with muskmelon seeds by multiplex PCR allowed the detection of the pathogen in seed lots with 4-46% association.

**Keywords:** Muskmelon, gummy stem blight, sanity of seeds, molecular detection.

## 1. INTRODUÇÃO

Os meloeiros nobres (*Cucumis melo* var. *reticulatus*) constituem parte das cucurbitáceas mais importantes para o cultivo em ambiente protegido na Região Norte do Paraná, nas estações quentes do ano (primavera/verão). A podridão gomosa, causada por *Didymella bryoniae* (Auersw) Rehm, anamorfo *Ascochyta cucumis* Fautrey & Roum [= *Phoma cucurbitacearum* Sacc.] constitui-se na doença mais importante nessa região (VIDA, 1995) e possui distribuição generalizada a nível mundial (BALA; HOSEIN, 1986; NEERGAARD, 1989; ZITTER et al., 1996).

Em ambiente protegido, tem-se constatado a agressividade do agente causal da podridão gomosa muito superior que em cultivo convencional. Esse fato se deve à favorabilidade dos efeitos diretos do ambiente aéreo e do solo sobre o patógeno e, indiretos, pelas mudanças fisiológicas e anatômicas nas plantas hospedeiras (VAN STEEKELENBURG, 1983; VIDA et al., 2001). Os danos causados pelo patógeno podem ser elevados ou totais, quando medidas de controle forem inadequadas ou não-empregadas (KEINATH, 2000; VIDA et al., 2004).

O patógeno *D. bryoniae* possui diferentes mecanismos de sobrevivência e um dos mais importantes é constituído pelas sementes (LEE et al., 1984; KOIKE, 1997; SUDISHA et al., 2006; GASPAROTTO et al., 2009). Danos diretos de *D. bryoniae* às sementes não têm sido relatados pela literatura. O principal papel da associação deste patógeno com as sementes é a sua disseminação para novos cultivos, constituindo fonte de inóculo primário para epidemias (LEE et al., 1984; SUDISHA et al., 2006; GASPAROTTO et al., 2009). 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).

Para a obtenção de resultados confiáveis da relação entre o transporte e a transmissão de patógenos pelas sementes e os danos na cultura, é

fundamental a existência de métodos que permitam detectar e quantificar o inóculo nas sementes (MENTEN, 1991). Para a detecção de *D. bryoniae* associada a sementes, são indicados os métodos de papel filtro (NEERGAARD, 1979; BRASIL, 2009) e de sintoma em plântulas (NEERGAARD, 1979). Porém, o teste de sanidade em papel filtro vem sendo inadequado para se detectar *D. bryoniae* associado a sementes de meloeiro nobre com infecção natural, pois ocorrem com frequência falsos negativos, inclusive em lotes com alta porcentagem de associação. O teste de sintomas em plantas é eficiente, porém o surgimento dos primeiros sintomas ocorre em média aos 40 dias, o que dificulta um rápido diagnóstico.

A detecção e a identificação de *D. bryoniae* por técnicas moleculares vêm sendo desenvolvida com sucesso (SOMAI et al., 2002; KOCH; UTKHEDE, 2002; 2004; KOCH et al., 2005). Um protocolo de PCR multiplex, utilizando dois conjuntos de oligonucleotídeos específicos para a detecção de *D. bryoniae* em tecidos sintomáticos de cucurbitáceas e esporos coletados em estufa plástica, foi desenvolvido com sucesso (KOCH; UTKHEDE, 2004). Para detecção do patógeno em sementes, um método utilizando hibridização com captura magnética e PCR multiplex em tempo real foi desenvolvido para a detecção simultânea de *D. bryoniae* e *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em sementes de melancia e melão. Resultados positivos foram alcançados, porém as sondas utilizadas não funcionaram para todos os isolados testados de *D. bryoniae* (HA et al., 2009).

Diante da necessidade de estabelecimento de uma técnica rápida, sensível e eficiente para a detecção do patógeno *Didymella bryoniae* associado a sementes de cucurbitáceas, especificamente a sementes de híbridos de meloeiro nobre, e do sucesso de trabalhos desenvolvidos para detecção e identificação por técnicas moleculares deste patógeno em tecidos sintomáticos de cucurbitáceas, desenvolveu-se este trabalho com o objetivo de avaliar métodos de extração de DNA total e tamanho da amostra de sementes de meloeiro nobre, visando o desenvolvimento de um método de detecção para o patógeno de *Didymella bryoniae* associado a sementes de híbridos de meloeiro nobre por PCR multiplex, utilizando oligonucleotídeos específicos previamente desenvolvidos para detecção do patógeno *D. bryoniae*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Teste de transmissão de podridão gomosa

Para a determinação do percentual de associação do patógeno às sementes, seguiu-se a metodologia descrita por Gasparotto et al. (2009). Para tanto, o substrato comercial Plant Max HF<sup>®</sup> foi autoclavado a 120°C, a 1 atm, durante duas horas, com intervalo de autoclavagem de 24 horas, seguido de mais duas horas de autoclavagem nas mesmas condições. Após um período de descanso de 72 horas, o substrato foi distribuído em bandejas de poliestireno expandido de 72 células. Em seguida, realizou-se o semeio das sementes dos híbridos Sunrise, Bonus II, New Prince e Louis adquiridas em casas comerciais da cidade de Maringá, PR. As bandejas foram mantidas em casa-de-vegetação semiclimatizada. Para cada híbrido foram utilizadas 200 sementes.

Após a emergência, todas as plântulas foram examinadas, diariamente, quanto a sintomas e sinais do patógeno de podridão gomosa. As plântulas com sintomas foram descartadas após a avaliação. Esse procedimento foi adotado para evitar disseminação de inóculo de plantas doentes para plantas saudáveis.

As avaliações foram realizadas durante 60 dias após a emergência e os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas apresentando sintomas de podridão gomosa, em qualquer órgão aéreo da planta.

### 2.2. Extração de DNA

Para estabelecimento de um protocolo para extração do DNA total de sementes de meloeiro nobre utilizou-se inicialmente um lote de sementes com 50% de *D. bryoniae* associado às sementes, detectado pelo teste de transmissão.

Foram testados três protocolos de extração: SDS, CTAB e o Kit 'Plant DNAzol® Reagent', preestabelecidos para a extração de DNA de sementes, plantas, plantas e patógenos, respectivamente. Três quantidades de sementes foram testadas: 50, 100 e 200 sementes. As sementes foram trituradas em

liquidificador em três condições: sem embebição; embebidas por 24 horas; embebidas por 48 horas.

O primeiro protocolo avaliado para extração do DNA total das sementes foi o descrito por Souza et al. (2002), que utiliza como detergente SDS (dodecil sulfato de sódio). As sementes foram trituradas em liquidificador por 10 minutos. A massa obtida foi, então, colocada em um cadinho e macerada com nitrogênio líquido até obter a consistência de um fino pó. Cerca de 300µL do macerado foram transferidos para um microtubo de 1,5mL e adicionou-se 400µL de tampão SET (NaCl 0,15M, Tris 0,02M, EDTA 1mM pH 8,0) mais 14,5µL de proteinase K (10mg/mL) e 18µL de SDS (25%). O material foi incubado por 1 hora à 55°C. Posteriormente, adicionou-se 400µL de NaCl 5M, homogeneizou-se em vórtex e centrifugou-se por 10 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo, sendo adicionado 150µL de Tris (0,01M pH 8,0) e centrifugou-se novamente por 10 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi, então, coletado e acrescentou-se ao mesmo 6µL de RNase (10mg/mL), incubou-se por meia hora a 37°C. Posteriormente, o volume do tubo foi completado com clorofórmio e centrifugou-se por 10 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e completou-se o volume com etanol 100%, deixando-se à -20°C overnight. Centrifugou-se, então, por 20 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se etanol 70%. Centrifugou-se, novamente, por 20 minutos a 12.000 rpm. O etanol foi retirado, os tubos invertidos e abertos sob papel absorvente esterilizado por 10 a 15 minutos até o etanol evaporar. O DNA foi ressuspendido adicionando-se 100µL de tampão TE (10mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1mM EDTA) e as amostras foram mantidas a 4°C.

No segundo protocolo, o DNA total das sementes foi extraído com base em Koenig et al. (1997), que utiliza como detergente o CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio). As sementes de melão foram trituradas em liquidificador por 10 minutos e a massa obtida foi macerada com nitrogênio líquido até obter a consistência de um fino pó. Aproximadamente 300µL do macerado foram transferidos para microtubos, onde foram adicionados 700µL de tampão de extração, que consiste na mistura dos tampões de lise nuclear (0,2M Tris pH 7,5; 0,05M EDTA e 2% CTAB), tampão de isolamento de DNA (0,2M Tris pH

7,5; 0,05M EDTA e 0,35M 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. A extração foi realizada com solvente orgânico, adicionando 500µL 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 limpos, adicionados de 5µL de uma suspensão contendo 20mg/mL de RNase e incubados em banho-maria por 30 minutos a 37°C. Em seguida, foram adicionados de 5µL 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 ressuspenso adicionando-se 100µL de tampão TE (10mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1mM EDTA) e as amostras foram mantidas a 4°C.

O terceiro protocolo de extração de DNA foi baseado no kit de extração 'Plant DNAzol® Reagent', que contém o detergente isotiocianato de guanidina. As sementes de melão foram trituradas em liquidificador por 10 minutos e a massa obtida foi macerada com nitrogênio líquido até obter a consistência de um fino pó. Aproximadamente 300µL do macerado foram transferidos para microtubos de 1,5mL. Adicionou-se 300µL do reagente de extração plant DNAzol, homogeneizou-se e o material foi incubado por 5 minutos a 25°C. Adicionou-se, então, 300µL de clorofórmio, homogeneizou-se e incubou-se pelo mesmo período. Após a incubação, o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 4 minutos. O sobrenadante foi transferido para microtubos limpos. Para a precipitação do DNA, foi adicionado 225µL de etanol 100%. O material foi homogeneizado e armazenado em temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, centrifugou-se a 9.400 rpm por 4 minutos e o sobrenadante formado foi descartado. O DNA foi lavado com 300µL da mistura 'Plant DNAzol Reagent' e etanol 100%, homogeneizado em agitador do tipo vortex e armazenado em temperatura ambiente por 5 minutos. Após a incubação, centrifugou-se o material (4 minutos, 9.400 rpm) e o sobrenadante foi

descartado. O 'Plant DNAzol Reagent' foi removido com a adição de 300µL de etanol 70% e procedeu-se centrifugação a 9.400 rpm por 4 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 70µL de tampão TE (10mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1mM EDTA) e as amostras foram mantidas a 4°C.

Quando necessário, foi efetuado o tratamento das amostras de DNA extraídas com cloreto de lítio (LiCl), para melhorar a qualidade do material extraído. Este procedimento foi realizado adicionando-se 300µL de LiCl 4M (mantido em gelo) a 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 e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo contendo 600µL de isopropanol. As amostras foram agitadas gentilmente e mantidas em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente. Então, foram novamente centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante, o DNA foi lavado com 100µL de etanol 70% gelado, e centrifugou-se as amostras 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 100µL de tampão TE (10mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1mM EDTA) e as amostras foram mantidas a 4°C.

Para a avaliação da sensibilidade do método foram utilizados quatro lotes de sementes (Sunrise, Bonus II, New Prince e Louis) descritos anteriormente. A extração de DNA total das sementes foi realizada de acordo com os protocolos com SDS e com CTAB descritos acima. Foram utilizadas 200 sementes por lote com três repetições cada.

### **2.3. PCR multiplex**

Para a investigação da presença de *D. bryoniae* a partir do DNA total extraído das sementes foram empregados os oligonucleotídeos específicos D7S (5'-CTACAATTGCGGGCTTTGC); D6 (5'-CGCCGATTGGACAAACTTAAA) 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 do patógeno *D. bryoniae*. Como controle positivo, foi utilizado DNA extraído de um isolado do patógeno, e como controle negativo, o mix da reação de PCR, sem adição de DNA.

A reação de PCR foi executada com volume total de 25µL, contendo DNA genômico, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 10xPCR Buffer, 0,2mM de dNTPs, 1U de Taq polimerase e de 1mM de cada oligonucleotídeo. 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. As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador Tpersonal Whatman Biômetra.

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

No teste de transmissão para avaliar a associação natural do patógeno *D. bryoniae* a quatro lotes de sementes de meloeiro nobre, as porcentagens de transmissão foram 46%, 36%, 34% e 4% para os híbridos Sunrise, Bonus II, New Prince e Louis, respectivamente, nas plantas mantidas durante sessenta dias em substrato comercial. As sementes do híbrido Sunrise apresentaram menor qualidade sanitária quanto a *D. bryoniae*, diferindo significativamente dos demais lotes de sementes (Quadro 2). Os híbridos Bonus II e New Prince apresentaram qualidade intermediária, não diferindo entre si. Louis apresentou sementes com melhor qualidade sanitária, sendo significativamente diferente dos demais.

Da mesma forma que descrito por Gasparotto (2006) e Gasparotto et al. (2009), o início dos sintomas correspondeu à época em que as folhas cotiledonares começaram a senescer e iniciaram se no caule, próximo as folhas cotiledonares senescentes, como lesões inicialmente aquosas e que, posteriormente, se tornaram necróticas, com coloração palha clara. As lesões cresciam longitudinalmente e transversalmente e, em muitas plântulas, ocorria o fendilhamento do caule. Também foi constatada a ocorrência de exsudação de goma e, nos tecidos com sintomas mais velhos, ocorreu à formação de numerosos corpos de frutificação negros. A coleta dessas estruturas e observações no microscópio óptico permitiu a constatação da presença de picnídios/conídios e pseudotécios com ascas e ascósporos. Em muitas plântulas, a colonização circunscreveu todo o caule, causando a seca do ramo na região situada acima da lesão, tombamento e morte. Sintomas semelhantes aos observados foram descritos por Chiu; Walker (1949), Bala; Hosein (1986), Koike (1997) e Kurozawa et al. (2005) para a podridão gomosa em cucurbitáceas.

Dentre os três métodos de extração de DNA testados, os métodos baseados nos detergentes CTAB e SDS após o tratamento com cloreto de lítio mostraram-se eficientes na extração do DNA total de sementes, proporcionando a obtenção de reações positivas quanto à presença do patógeno *D. bryoniae* (Quadro 1). As reações foram consideradas positivas

quando ocorreu a amplificação de dois fragmentos com aproximadamente 535 pb e 461 pb (KOCH; UTKHEDE, 2004).

**Quadro 1.** Amostras positivas para o patógeno *Didymella bryoniae* em sementes de melão nobre híbrido Sunrise por PCR multiplex em relação a amostras avaliadas.

Quantidade de sementes maceradas	Protocolo de extração de DNA total	Tempo de embebição		
		0	24h	48h
		Sub-amostras positivas/avaliadas	Sub-amostras positivas/avaliadas	Sub-amostras positivas/avaliadas
50	Plant	0/1	0/2	0/2
100	DNAzol®	0/4	0/5	0/7
200	Reagent	0/8	0/9	0/11
50		0/1	2/2	0/2
100	CTAB	2/4	3/5	0/7
200		8/8	0/9	0/11
50		1/1	2/2	0/2
100	SDS	4/4	1/5	0/7
200		8/8	3/9	0/11

Já, o protocolo realizado com o kit 'Plant DNAzol®Reagent', mesmo após o tratamento das amostras com cloreto de lítio, não foi adequado para extração de DNA total de sementes. As amostras de DNA obtidas por este método formaram precipitados grandes, esbranquiçados e de difícil dissolução. Mesmo realizando diferentes diluições a partir do DNA tratado, as amostras não amplificaram nenhuma resposta positiva para a presença de *D. bryoniae* associado às sementes. Este resultado é um falso negativo, já que o lote de sementes avaliado apresentava uma infestação natural de 50% com o referido patógeno e as amostras analisadas foram distribuídas de forma homogênea para os três protocolos.

A embebição prévia das sementes para extração do DNA apresentou influencia negativa no processo em todos os protocolos testados. Para o protocolo com SDS com 200 sementes sem embebição, 100% das amostras apresentaram resultado positivo. Quando as sementes foram embebidas por 24

horas, o número de amostras positivas caiu para 33% e, para sementes embebidas por 48 horas, não houve nenhuma reação positiva. Resultados semelhantes foram obtidos quando se utilizou o protocolo com CTAB, com extração de DNA de 200 sementes sem embebição, enquanto que amostras de DNA de sementes embebidas por 24 ou 48 horas não resultaram em nenhuma reação positiva.

Quanto à variável quantidade de sementes necessárias para a detecção do patógeno *D. bryoniae* em sementes pela PCR multiplex, as três quantias testadas (50, 100 e 200 sementes) foram satisfatórias quando se utilizou o protocolo com SDS. Para o protocolo com o detergente CTAB, houve 100% de reações positivas quando se utilizou 200 sementes, 50% quando se utilizou 100 sementes e não houve reações positivas para 50 sementes. Isso indica uma maior eficiência do protocolo SDS em relação ao CTAB, com 100% de amostras positivas para SDS e 76,9% para o protocolo CTAB.

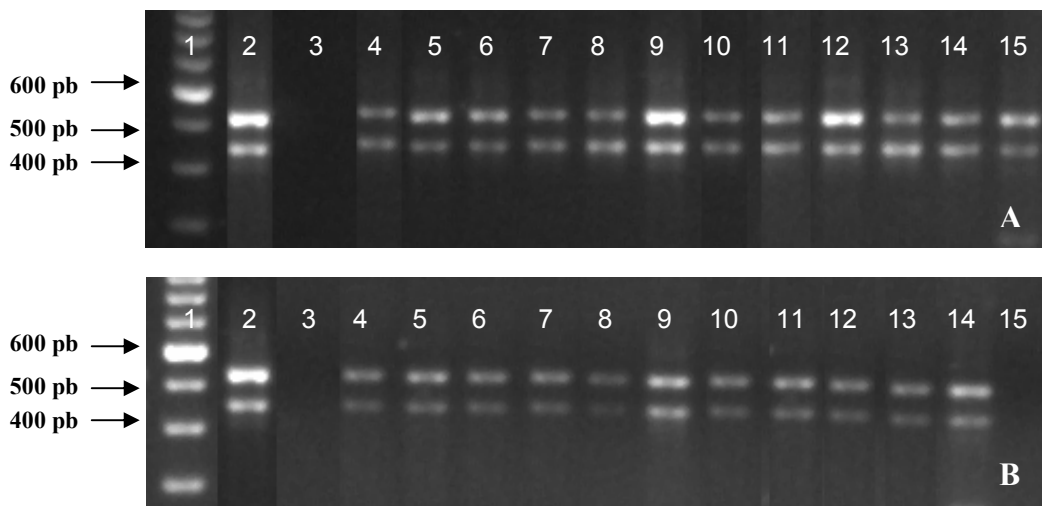
**Quadro 2.** Detecção molecular de *Didymella bryoniae* associado a sementes de híbridos de meloeiro nobre por de PCR multiplex em relação a sementes infectadas de 4 a 46%.

Híbrido	Plântulas sintomáticas (%) <sup>1</sup>	Detecção por PCR multiplex (sub-amostras positivas/analizadas)	
		SDS <sup>2</sup>	CTAB <sup>2</sup>
Sunrise	46 a	3/3	3/3
Bonus II	36 b	3/3	3/3
New Prince	34 b	3/3	3/3
Louis	4 c	3/3	2/3

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra, pertencem ao mesmo agrupamento pelo teste de Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade.

<sup>2</sup> SDS (dodecil sulfato de sódio); CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio).

Quanto à detecção do patógeno em sementes do híbridos Sunrise, Bonus II, New Prince e Louis, foi possível detectar o patógeno nas amostras de DNA extraídas dos quatro lotes de sementes, tanto pelo protocolo de extração com o detergente SDS quanto com CTAB, após tratamento com cloreto de lítio (Figura 1).



**Figura 1.** Gel de eletroforese apresentando especificidade na reação múltipla para *Didymella bryoniae* em amostras de DNA total de sementes. A) Amostras extraídas pelo protocolo SDS: 1- 100-pb ladder; 2- controle positivo; 3- controle negativo; 4 a 6- Híbrido Sunrise; 7 a 9- Híbrido Bonus II; 10 a 12- Híbrido New Prince e 13 a 15- Híbrido Louis. B) Amostras extraídas pelo protocolo CTAB: 1- 100-pb ladder; 2- controle positivo; 3- controle negativo; 4 a 6- Híbrido Sunrise; 7 a 9- Híbrido Bonus II; 10 a 12- Híbrido New Prince e 13 a 15- Híbrido Louis.

Quando o DNA total foi extraído pelo protocolo com SDS nos quatro híbridos avaliados (Quadro 2), 100% das amostras foram positivas para o patógeno. Quando utilizou-se o protocolo com CTAB, houve 100% de amostras positivas para os híbridos Sunrise, Bonus II e New Prince e de 66,7% de amostras positivas para o híbrido Louis. Relacionando-se os resultados do teste de transmissão com a técnica de PCR multiplex, verificou-se sensibilidade deste teste para detecção de *D. bryoniae* associada a lotes de sementes, ou seja, foi possível detectar o patógeno em todos os híbridos testados com associação de 4 a 46%.

Os resultados apresentados mostram que o protocolo baseados nos detergentes SDS (SOUZA et al., 2002) e CTAB (KOENIG et al., 1997) podem ser utilizados com sucesso na extração de DNA de sementes para a detecção qualitativa do patógeno *D. bryoniae* associado a sementes de meloeiro nobre através da técnica de PCR multiplex com os primers UNLO28S22, D7S e D6.

Para a detecção de patógenos associados a sementes, a técnica de PCR apresenta grande potencial. No entanto, compostos inibitórios podem limitar severamente a aplicação da PCR para análise de sanidade de sementes. Após a extração do DNA das sementes com os três protocolos

avaliados neste trabalho, foram obtidas amostras com DNA concentrado e de difícil dissolução. Então procedeu-se o tratamento de todas as amostras com cloreto de lítio para melhorar a qualidade do DNA extraído. Ainda assim, a técnica de extração utilizando-se o protocolo “Plant DNAzol Reagent” não foi sensível para a detecção.

Vários autores descreveram problemas no isolamento e purificação de DNA vegetal de boa qualidade (HENSON; FRENCH, 1993; MARTIN et al., 2000; JACCOUD FILHO et al., 2002; DUARTE; BOA, 2005). Segundo Romano; Brasileiro (1999), para a liberação do DNA, as membranas celulares devem ser rompidas e essa etapa é realizada pela ação de um detergente como SDS (dodecil sulfato de sódio) ou CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio). O método mais utilizado com sucesso para diferentes espécies vegetais é o baseado no uso do detergente CTAB, pois este solubiliza as membranas, formando, com o DNA, um complexo que facilita posterior precipitação (ROMANO; BRASILEIRO, 1999). Os protocolos que se baseiam no detergente SDS se fundamentam na precipitação simultânea de proteínas e polissacarídeos em sua presença e altas concentrações de acetato de potássio. Neste trabalho, tanto a utilização do detergente CTAB quanto SDS foram eficientes na extração do DNA total a partir de sementes de meloeiro nobre.

De acordo com os resultados, a embebição das sementes diminuiu a qualidade do DNA extraído. Isso pode ter ocorrido porque durante a embebição as sementes entraram em processo de germinação, ocorrendo um aumento de substâncias que são inibidoras a reações enzimáticas, como polissacarídeos e compostos fenólicos.

Resultados contrários foram observados para *Alternaria radicina* associado a sementes de cenoura, onde a incubação prévia das sementes por cinco dias foi necessária para a detecção do patógeno. Durante a incubação, as sementes foram mantidas sob condições de alta umidade para aumentar a biomassa fúngica. Desta forma, *A. radicina* foi detectado a partir de lotes de sementes de cenoura com infestação natural tão baixo como 0,3% (PRYOR; GILBERTSON, 2001). Para *D. bryoniae* em sementes de meloeiro nobre a incubação durante 24 ou 48 horas não resultou em aumento da massa fúngica,

possivelmente pelo patógeno ficar localizado na casca e internamente às sementes e não causar danos às mesmas (LEE et al., 1984).

Neste trabalho, todas as amostras de DNA total obtidas através da extração com o protocolo com guanidina, bem como amostras de DNA extraídas pelos demais protocolos cujas sementes previamente embebidas, mesmo após o tratamento com cloreto de lítio, apresentaram precipitado de DNA grande, esbranquiçado e de difícil ressuspensão. Desta forma, esses resultados ocasionaram reações de PCR multiplex negativas para a presença de *D. bryoniae*.

A técnica de PCR, quando aplicada à patologia de sementes, pode enfrentar alguns fatores adversos a sua otimização, como a inibição das reações enzimáticas por substâncias liberadas pelas sementes como polifenóis, polissacarídeos, etc. (JACCOUD FILHO et al., 2002; HENSON; FRENCH, 1993). Ainda, segundo os autores, a contaminação por polissacarídeos consiste na principal contaminação que afeta a pureza do DNA extraído de plantas. Esses carboidratos podem inibir a atividade de várias enzimas usadas em manipulações biológicas de DNA, tais como ligases, polimerases e enzimas de restrição. A maioria dos métodos de extração empregados não separam eficientemente o DNA dos polissacarídeos, provavelmente devido à similaridade estrutural entre esses dois tipos de polímeros. A contaminação de polissacarídeos depende da espécie, tecido e condições fisiológicas da planta. Certas espécies apresentam DNA muito contaminado por polissacarídeo, tornando difícil a ressuspensão do DNA precipitado. De acordo com o exposto, os resultados falsos negativos encontrados neste trabalho devem-se, possivelmente, à associação de grande quantidade de polissacarídeos ao DNA extraído das amostras de sementes.

Não foi possível investigar a sensibilidade do teste em lotes com menos de 4% de associação, pois buscou-se trabalhar com lotes de sementes de meloeiro nobre com infecção natural para evitar resultados falsos positivos devido à inoculação artificial. Para a detecção conjunta de *D. bryoniae* e *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* associados às sementes de melancia e melão por hibridização magnética e PCR multiplex em tempo real, Ha et al. (2009) necessitaram de sete ciclos a mais para a detecção do patógeno em sementes

de melão infestadas naturalmente (0,02%) do que para a detecção em lotes de sementes de melancia infestadas artificialmente com o mesmo nível de contaminação. De acordo com os autores, isto ocorreu porque as sementes de melancia infestadas artificialmente continham níveis mais altos de micélio, localizado na superfície do tegumento, o que permitiu melhor extração e produção de DNA do fungo em comparação com sementes com infecção natural mais profunda.

O protocolo estabelecido neste trabalho mostra-se como uma nova opção, rápida e sensível para a detecção de *D. bryoniae* associado às sementes de meloeiro nobre. A detecção do patógeno é fundamental para evitar a utilização de sementes infectadas/infestadas evitando-se, dessa maneira, a disseminação do patógeno para áreas indenens e o estabelecimento de epidemias precoces.

#### 4. CONCLUSÕES

- *D. bryoniae* foi detectada em sementes de meloeiro nobre através da técnica de PCR multiplex com os protocolos de extração SDS e CTAB, com 200 sementes sem pré-embebição, em todos os híbridos testados, com associação entre 4 a 46%.
- *D. bryoniae* foi detectada nas quantidades 50, 100 e 200 sementes de meloeiro nobre Sunrise com 50% de associação utilizando o protocolo SDS e PCR multiplex.
- A pré-embebição das sementes em água antes da extração do DNA inviabilizou os testes de detecção de *D. bryoniae*.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALA, G.; HOSEIN, F. Studies on gummy stem blight disease of cucurbits in Trinidad. **Tropical Agriculture**, v.63, n.2, p.195-197, 1986.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de Sementes**/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária – Brasília:Mapa/ACS, 2009. 399 p.

CHIU, W. F.; WALKER, J. C. Morphology and variability of the cucurbit black rot fungus. **Journal of Agricultural Research**, v. 78, p. 81-102, 1949.

DUARTE, V.; BOA, E. Enfoques usados na diagnose de doenças de plantas. **Revisão anual de patologia de plantas**, v.13, p. 31-47, 2005.

GASPAROTTO F. **Avaliação da sanidade de sementes de híbridos de meloeiro nobre indicados para cultivo protegido**. Maringá: UEM, 42p (Tese Mestrado), 2006.

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.

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.

HENSON, J. M.; FRENCH, R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. **Annual Reviews Phytopathology**, v. 31, p.81-109, 1993.

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

KEINATH, A. P. Effect of protectant fungicide application schedules on gummy stem blight epidemics and marketable yield of watermelon. **Plant Disease**, v.84, p.254-260, 2000.

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.

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.

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.; LI, P. C. H.; UTKHEDE, R. S. Evaluation of thin films of agarose on glass for hybridization of DNA to identify plant pathogens with microarray technology. **Anal. Biochem**, v. 342, p. 93-102, 2005.

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.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A, REZENDE, J. A. M.. Doenças das cucurbitáceas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**, 2, 4ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p.293-302, 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.

MARTIN, R. R.; JAMES, D.; LÉVESQUE, C. A. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Annual Review of Phytopathology*, v.38, p. 207-239, 2000.

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, 1991. p.115-136.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. v.1. London: Macmillan, 1979. 839p.

NEERGAARD, E. Studies of *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm: development in the host. **Journal of Phytopathology**, v.127, p.107-115, 1989.

PRYOR, B. M.; GILBERTSON, R. L. A PCR-based assay for detection of *Alternaria radicina* on carrot seed. **Plant Disease**, v. 85, p. 18-23, 2001.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. **Biociência**, v.7, p.40-43, 1999.

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, C. S.; PEREIRA, C. D.; BONETTI, A. M.; GOULART, L. R.; KERR, W. R. Extração de DNA genômico de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) para análises AFLP. **Horticultura Brasileira**, v.20, n.2, 2002.

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. Manejo de doenças em cultivo protegido. In: BRANDAO FILHO, J. U. T.; CONTIERO, R. L.; ANDRADE, J. M. B. (Org.). **Cultivo protegido**. Maringá: Imprensa Universitária/UEM, 1995. p.25-34.

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

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.

ZITTER, T.A.; HOPKINS, D.L.; THOMAS, C.E. **Compendium of cucurbit diseases**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1996. 87pp.

## **CAPÍTULO IV**

### **INFECÇÃO LATENTE E SISTÊMICA DE *Didymella bryoniae* EM MELOEIRO NOBRE**

## RESUMO

*Didymella bryoniae*, agente causal da podridão gomosa, é um importante patógeno em meloeiro nobre e outras cucurbitáceas em cultivo protegido. Há fortes suspeitas da ocorrência de infecção latente e sistêmica de *D. bryoniae* em plantas de meloeiro nobre, no entanto, sem comprovação. Objetivou-se, com este trabalho, investigar a hipótese da ocorrência de infecção latente e sistêmica de *D. bryoniae* em plantas de meloeiro nobre assintomáticas, empregando PCR multiplex, com oligonucleotídeos específicos para *D. Bryoniae*, anteriormente desenvolvidos para detecção do patógeno em caules de cucurbitáceas sintomáticos. Constatou-se a presença de *D. bryoniae* no caule e folhas cotiledonares de plantas assintomáticas por PCR multiplex, comprovando a ocorrência de infecção latente do patógeno, também foi comprovada a infecção sistêmica através da detecção do patógeno em fragmentos assintomáticos localizados a 5, 15 e 30cm do tecido sintomático.

**Palavras-chave:** Podridão gomosa, *Cucumis melo* var. *reticulatus*, infecção, detecção molecular.

## ABSTRACT

**Latent and systemic infection of *D. bryoniae* in muskmelon.** *D. bryoniae*, causal agent of gummy stem blight, is an important pathogen in muskmelon and other cucurbits in greenhouses. Evidences show the occurrence of latent and systemic infection *D. bryoniae* muskmelon plants, however, unproven. As soon, this work had the objective to prove the occurrence of latent and systemic infection of *Didymella bryoniae* in asymptomatic muskmelons plants employing multiplex PCR with primers specific for *D. bryoniae* previously developed to detect this pathogen in stems of symptomatic cucurbits. It was verified the presence of *D. bryoniae* in stem and cotyledons of asymptomatic plants using PCR multiplex, proving the occurrence of latent infection of the pathogen, has also been proven the systemic infection by detecting the pathogen in asymptomatic fragments located 5, 15 and 30 cm of distance of symptomatic tissue.

**Keywords:** Gummy stem blight, *Cucumis melo* var. *reticulatus*, infection, molecular detection.

## 1. INTRODUÇÃO

A podridão gomosa, causada por *Didymella bryoniae* (Auersw) Rehm, anamorfo *Ascochyta cucumis* Fautrey & Roum [= *Phoma cucurbitacearum* Sacc.] é a mais destrutiva doença em meloeiros nobres (*Cucumis melo* var. *reticulatus*) em cultivo protegido no Estado do Paraná, podendo causar danos de até 100% (VIDA et al., 1993; VIDA et al., 2004). Um 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). A importância da infecção de sementes não está apenas na possibilidade do desenvolvimento da doença na fase inicial da cultura, mas também na introdução do inóculo em áreas não infestadas.

Resultados de trabalhos desenvolvidos recentemente evidenciaram que *D. bryoniae* originada de sementes pode apresentar infecção latente em plantas de meloeiro. 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 manifestaram após o transplante para solo (GASPAROTTO, 2006).

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).

Um dos maiores problemas da infecção latente é a 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 de meloeiro nobre em ambiente protegido. O patógeno é disseminado, eficientemente, por instrumentos de poda, o que resulta em severas epidemias na cultura, com ocorrência de danos de até 100% (VIDA et al., 2004).

Vários trabalhos na literatura relatam o sucesso da utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) e de PCR em tempo real, com oligonucleotídeos específicos, na detecção de infecção latente de diversos patógenos associados a plantas cultivadas, como *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). Para *D. Bryoniae*, há disponibilidade de um conjunto de oligonucleotídeos específicos e um protocolo de PCR multiplex para a detecção em tecidos de cucurbitáceas com sintomas de podridão gomosa (KOCH; UTKHEDE, 2004). A adequação deste protocolo para a detecção do patógeno em tecidos assintomáticos mostra-se como uma alternativa na detecção de infecções latente e sistêmica de *D. bryoniae*.

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 MÉTODOS

Inicialmente foi desenvolvido um experimento para investigação do período entre a emergência e o aparecimento de sintomas de podridão gomosa. Para a investigação da infecção latente de *D. bryoniae* em plântulas de meloeiro nobre foram desenvolvidos três experimentos: 1) Adequação do protocolo de extração de DNA e os conjuntos de oligonucleotídeos para detecção do patógeno em tecidos sintomáticos, já existente e para a detecção em tecidos e assintomáticos das plântulas; 2) Investigação da infecção latente do patógeno extraído-se o DNA total da região do colo das plântulas assintomáticas; 3) Investigação da infecção latente em plântulas através da extração de DNA total das folhas cotiledonares e definitivas.

Foi realizado, também, um experimento para determinar a infecção sistêmica do patógeno em plantas de meloeiro nobre.

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

Para a observação do período entre a emergência de plântulas de meloeiro nobre e o aparecimento de sintomas de podridão gomosa realizou-se o semeio de 200 sementes de meloeiro nobre Sunrise em substrato comercial plant Max HF, esterilizado e disposto em bandejas de poliestireno, mantidas em casa-de-vegetação semiclimatizada.

Após a emergência, todas as plântulas foram examinadas, diariamente, quanto à presença de sintomas de podridão gomosa e sinais do patógeno. As plântulas foram avaliadas e aquelas com sintomas foram descartadas. Esse procedimento foi adotado para evitar disseminação de inóculo de plantas doentes para plantas sadias. As avaliações foram realizadas durante 70 dias após a emergência e a partir do início dos sintomas realizados com intervalo de cinco dias.

## **2.2. Infecção latente**

Para a investigação da infecção latente por PCR multiplex foram produzidas plantas de meloeiro nobre em casa-de-vegetação. Sementes dos híbridos Sunrise, Bonus II, Louis e Prince Hakucho adquiridas em casa comercial de Maringá-PR foram utilizadas nos testes. As sementes foram pré-germinadas entre papéis germitest umedecidos com água em germinador à temperatura de 28°C. Quando do início da emissão radícula, estas foram semeadas em bandejas de poliestireno de 72 células contendo substrato comercial Plant Max HF<sup>®</sup>. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação por 60 dias e foram avaliadas diariamente quanto ao aparecimento de sintomas de podridão gomosa e ou sinais do patógeno. As plantas com sintomas foram separadas das sadias.

### **2.2.1. Adequação do protocolo para plantas sintomáticas e assintomáticas de meloeiro nobre**

No primeiro ensaio para detecção de infecção latente foram utilizadas plântulas produzidas em casa-de-vegetação a partir de três lotes de sementes (híbridos Sunrise, Bonus II e Prince Hakucho). Coletaram-se plântulas assintomáticas (tratamento 1), plântulas apresentando sintomatologia de podridão gomosa (tratamento 2) e plântulas sintomáticas apresentando sinais de frutificação do patógeno (tratamento 3) aos 50 dias após a emergência para cada híbrido. Cada planta 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 armazenado em freezer a -20°C até o momento da extração de DNA. Neste primeiro ensaio, a extração de DNA foi realizada a partir de um conjunto de cinco plantas maceradas juntas em cada tratamento e para cada lote de sementes.

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

No segundo ensaio foi realizada a detecção de infecção latente por PCR multiplex do DNA extraído de caule de plântulas. Foram utilizadas 60

plântulas de meloeiro nobre do híbrido Bonus II, obtidas a partir de um lote de sementes com infecção de 50% pelo patógeno. Realizaram-se três coletas, a primeira um dia após a emergência das plântulas, sendo coletadas vinte plantas assintomáticas aleatoriamente. A segunda coleta foi realizada 20 dias após a emergência, coletando-se vinte plantas assintomáticas. Na terceira coleta aos 40 dias da emergência, coletaram-se as 18 plantas restantes, pois duas plantas deste lote apresentaram sintomatologia de podridão gomosa no decorrer do experimento e foram descartadas. Nas coletas, cada planta 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 armazenado em freezer a -20°C até o momento da extração de DNA. Para extração do DNA total o caule de cada planta foi macerado individualmente constituindo uma amostra.

### **2.2.3. Investigação da infecção latente a partir de folhas de meloeiro nobre**

Para avaliação de infecção latente, através de PCR multiplex de DNA extraído das folhas de plântulas de meloeiro nobre, foram utilizadas oitenta sementes comerciais do híbrido de meloeiro nobre Sunrise, com associação de 48% com o patógeno *D. bryoniae*. Foram realizadas coletas de material vegetal a cada vinte dias, a primeira coleta foi realizada um dia após a emergência das plantas, sendo retirada uma das folhas cotiledonares. A segunda coleta foi realizada 20 dias após a emergência, coletando-se a outra folha cotiledonar. Na terceira coleta, 40 dias após a emergência, coletou-se a primeira folha definitiva. A última coleta foi realizada aos 60 dias, coletando-se a segunda folha definitiva. Em cada coleta, as folhas foram lavadas individualmente em água destilada e armazenadas em freezer a -20°C até o momento da extração de DNA. As folhas foram maceradas individualmente para extração do DNA total, cada uma constituindo uma amostra.

### **2.3. Infecção Sistêmica**

Para a determinação da infecção sistêmica por PCR multiplex, sementes do híbrido de meloeiro nobre Sunrise foram pré-germinadas e 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 solo sob estufa plástica coberta com polietileno de alta densidade (150 $\mu$ m). O solo foi previamente corrigido com calcário calcítico de acordo com análise prévia, elevando-se a saturação de bases (V%) para 80%. Como adubação de base foram utilizados 2,0 litros de composto orgânico aplicado 30 dias antes do transplante. O solo foi adubado com 7,2g de cloreto de potássio, 53g de superfosfato simples e 13g de uréia por metro linear de sulco de cultivo um dia antes do transplante. Após 25 dias do transplante, foi realizada uma adubação de cobertura com 13g de uréia por metro linear de sulco de cultivo.

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 a 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.

Sessenta dias após o transplante, vinte plantas do híbrido Sunrise, produzidas sob estufa plástica e apresentando visualmente sintomas localizados de podridão gomosa, foram coletadas para análise de infecção sistêmica, através de corte no coleto.

O caule de cada planta foi cortado em quatro fragmentos de 5cm 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.

## 2.4. 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 300µL do macerado foram transferidos para microtubos, onde foram adicionados 700µL de tampão de extração, que consiste na mistura dos tampões de lise nuclear (0,2M Tris pH 7,5; 0,05M EDTA e 2% CTAB), tampão de isolamento de DNA (0,2M Tris pH 7,5; 0,05M EDTA e 0,35M 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 500µL 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 5µL de uma suspensão contendo 20mg/mL de RNase e incubados em banho-maria por 30 minutos a 37°C. Em seguida, foi adicionado, em cada tubo, 5µL 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 100µL de tampão TE (10mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1mM 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 300µL 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 600µL 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 100µL 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 ressuscitado, adicionando-se 100µL de tampão TE (10mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1mM EDTA) e as amostras foram mantidas a 4°C.

## 2.5. 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'-CGCCGATTGGACAAA ACTT AAA) e UNLO28S22 (5'-GTTTCTTTTCCTCCGCT TATTGATATG), 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*.

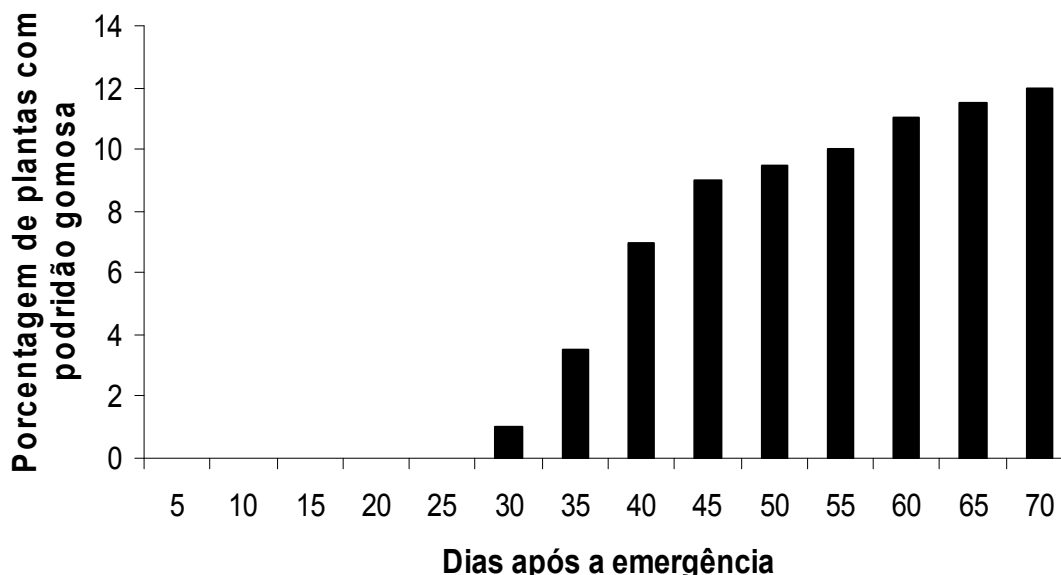
As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador Tpersonal Whatman Biometra, em microtubos contendo 25µL da mistura de reação constituída por 50mM de KCl; 10mM de Tris; pH 7,5; 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,5 unidades de Taq DNA polimerase; 0,2mM de cada dNTP; 15pmol de cada oligonucleotídeos e 40ng 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 (0,5µg/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 dos sintomas de podridão gomosa em plantas de meloeiro nobre, foi de 29 dias para a primeira planta e de 68 dias após a emergência para a última planta (Figura 01). A maioria das plantas que ficaram doentes apresentaram sintomas de podridão gomosa entre os 35 a 45 dias após a emergência. Estes resultados evidenciam, mais uma vez, a ocorrência de latência do patógeno *D. bryoniae* em meloeiro nobre com inóculo oriundo de sementes.



**Figura 1.** Porcentagem de plantas de meloeiro nobre híbrido Sunrise com podridão gomosa em casa-de-vegetação.

Os sintomas iniciaram-se no caule, na região de inserção das folhas cotiledonares, como lesões inicialmente aquosas e que, posteriormente, tornaram-se necróticas, com coloração palha clara. Observou-se que as lesões cresciam longitudinalmente e transversalmente e, em muitas plântulas, ocorria o fendilhamento do caule. Também foi constatada, nas lesões, a ocorrência de exsudação de goma e, nos tecidos com sintomas mais velhos, ocorreu à formação de numerosos corpos de frutificação negros. A coleta dessas

estruturas e observações ao microscópio óptico permitiu a constatação da presença de picnídios/conídios e pseudotécios com ascas e oito ascósporos/asca. Em muitas plântulas, a colonização circunscreveu todo o caule, causando a seca do ramo na região situada acima da lesão, tombamento e morte. Sintomas semelhantes em plantas de cucurbitáceas foram observados nos trabalhos desenvolvidos por Wiant (1945), Chiu e Walker (1949), Sudisha et al. (2006), Gasparotto et al. (2009).

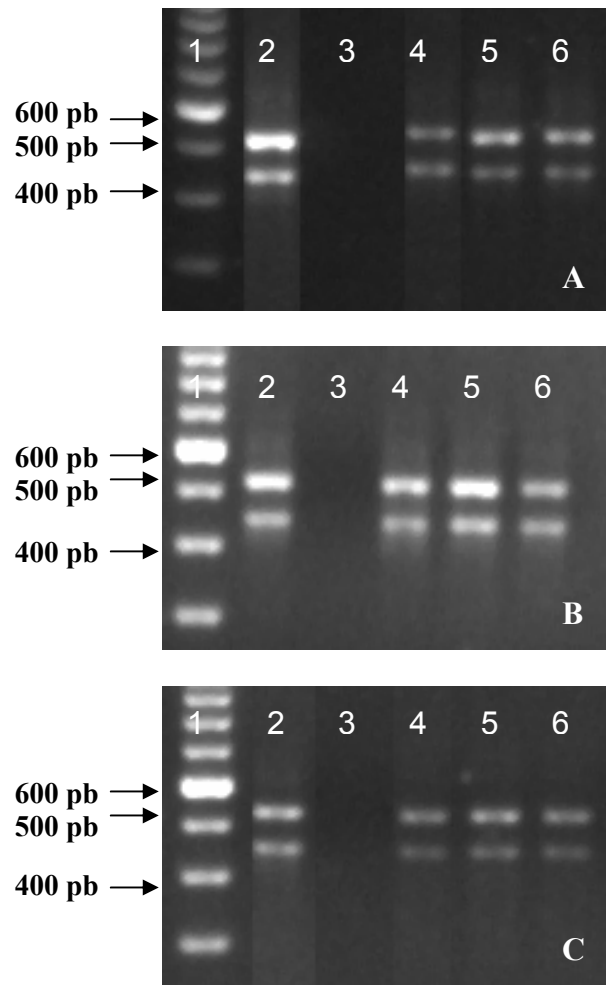
### **3.2. Infecção latente**

#### **3.2.1. Adequação do protocolo para plantas sintomáticas e assintomáticas de meloeiro nobre**

No primeiro experimento, realizado para comprovar a infecção latente do patógeno e adequar o protocolo de PCR foi possível a partir de todas as amostras de DNA total extraídas de plantas assintomáticas, sintomáticas e sintomáticas com corpos de frutificação de *D. bryoniae* aos 50 dias após a emergência, detectar o patógeno associado aos três híbridos avaliados. Através de PCR multiplex, com os oligonucleotídeos específicos, houve a amplificação de dois fragmentos genômicos de aproximadamente 535 pb (UNLO28S22 + D7S) e 461 pb (UNLO28S22 + D6) (KOCH; UTKHEDE, 2004), houve adequação do método (Figura 2).

Os resultados obtidos mostram que no DNA total extraído do caule dos conjuntos de plantas de todos os híbridos analisados, assintomáticos e sintomáticos, 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 (Figura 2). A amplificação, a partir das plantas que estavam assintomáticas até os 50 dias em condição de casa-de-vegetação, indica que o patógeno *D. bryoniae* estava associado à pelo menos uma das cinco plantas maceradas que constituíram a amostra. Este fato corrobora a hipótese de que o patógeno apresenta infecção latente em plantas de meloeiro nobre.





**Figura 2.** Gel de eletroforese apresentando especificidade na reação múltipla para *Didymella bryoniae*. A) Híbrido Sunrise: 1- 100-pb ladder; 2- Isolado de *D. bryoniae* (controle positivo); 3- controle negativo; 4- Plantas assintomáticas, 5- Plantas sintomáticas, 6- Plantas sintomáticas com corpos de frutificação; B) Híbrido Bonus II: 1- 100-pb ladder; 2- Isolado de *D. bryoniae* (controle positivo); 3- controle negativo; 4- Plantas assintomáticas, 5- Plantas sintomáticas, 6- Plantas sintomáticas com corpos de frutificação; C) Híbrido New Prince: 1- 100-pb ladder; 2- Isolado de *D. bryoniae* (controle positivo); 3- controle negativo; 4- Plantas assintomáticas, 5- Plantas sintomáticas, 6- Plantas sintomáticas com corpos de frutificação.

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

Através de PCR multiplex, a partir das amostras individuais de DNA total extraído do caule das plântulas, foi possível detectar o patógeno *D. bryoniae* associado a sete plântulas das 20 coletadas um dia após a emergência; a nove de 20 plântulas coletadas aos 20 dias após a emergência; e a 12 das 18

plantas coletadas quarenta dias após a emergência (Quadro 1). Foram consideradas positivas as amostras em que houve a amplificação dos fragmentos genômicos de 535 pb e 461 pb, que são específicos para *D. bryoniae*.

As 28 respostas positivas para presença de *D. bryoniae* das 58 amostras representam 48% de associação entre o patógeno *D. bryoniae* e as plântulas de meloeiro nobre. Se considerarmos que duas plântulas apresentaram sintomatologia de podridão gomosa aos 35 dias e, por isso, não foram utilizadas na última avaliação, o percentual de plântulas com o patógeno associado foi de 50%. Este valor corresponde ao esperado, já que no teste de transmissão realizado preliminarmente determinou-se um percentual de associação de 50% entre *D. bryoniae* e o lote de sementes do híbrido Bonus II, utilizado no experimento.

**Quadro 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.

<b>Data da coleta</b>	<b>Plantas com <i>D. bryoniae</i> em infecção latente/Número de plantas coletadas</b>
1 dia após a emergência	7/20
20 dias após a emergência	9/20
40 dias após a emergência	12/18

### **2.2.3. Investigação da infecção latente a partir de folhas de meloeiro nobre**

No Quadro 2 encontra-se os resultados da análise por PCR multiplex, com base nos oligonucleotídeos específicos para a presença do patógeno *D. bryoniae*, das amostras de DNA total extraído das folhas e a ocorrência de sintomas de podridão gomosa nas plantas ao final do experimento em casa-de-vegetação.

Na primeira avaliação (1 dia após a emergência), coletaram-se 80 folhas cotiledonares sem quaisquer sintomas ou sinais de patógenos. Destas foi possível detectar o patógeno *D. bryoniae*, através da reação de PCR multiplex com oligonucleotídeos específicos, em nove amostras de DNA total

(11,3%); na segunda avaliação (20 dias após a emergência) detectou-se a presença do patógeno em 26 amostras de DNA total de folhas cotiledonares das 80 coletadas (32,5%). Não foi possível detectar o patógeno associado a nenhuma das amostras de DNA de folhas definitivas coletadas aos 40 e 60 dias após a emergência.

Ao final do período experimental (70 dias) das oitenta plantas avaliadas vinte e quatro (30%) apresentaram sintomatologia de podridão gomosa em condição de casa-de-vegetação. Considera-se período de latência o período de tempo decorrido entre a inoculação (contato entre patógeno e hospedeiro) e o aparecimento de estruturas reprodutivas do patógeno. Então, neste experimento o período de latência mínimo foi de 29 dias e o máximo de 68 dias. Períodos de latência curtos significam patógeno agressivo, hospedeiro suscetível e condição ambiente favorável. Períodos latentes prolongados indicam hospedeiro resistente e/ou patógeno menos agressivo e/ou ambiente desfavorável (AMORIM, 1995).

**Quadro 2.** Detecção de *Didymella bryoniae* em plântulas assintomáticas (%) de meloeiro nobre por PCR multiplex e ocorrência de sintomas em plantas adultas de meloeiro.

Frequência (%) <sup>1</sup>	Detecção de <i>Didymella bryoniae</i> latente				Ocorrência de podridão gomosa em plantas adultas
	1ª Folha Cotiledonar	2ª Folha Cotiledonar	1ª Folha Definitiva	2ª Folha Definitiva	
11,3	+ <sup>2</sup>	+	-	-	+ <sup>4</sup>
18,7	- <sup>3</sup>	+	-	-	+ <sup>5</sup>
2,5	-	+	-	-	-
67,5	-	-	-	-	-

<sup>1</sup> Porcentagem de plantas que apresentaram mesmo padrão de detecção de 80 avaliadas.

<sup>2</sup> + = amplificação de dois fragmentos genômicos de 535 pb (UNLO28S22 + D7S) e 461 pb (UNLO28S22 + D6), sendo constatada a presença do patógeno *D. bryoniae*;

<sup>3</sup> - = quando não houve a amplificação do par de bandas.

<sup>4</sup> + = presença de sintomas de podridão gomosa nas plantas na avaliação final aos 70 dias após emergência;

<sup>5</sup> - = ausência de sintomas de podridão gomosa aos 70 dias após emergência.

Na detecção em folhas cotiledonares, via PCR multiplex com oligonucleotídeos específicos, foram detectadas 26 plântulas com *D. bryoniae*

associada. No entanto, apenas 24 destas plântulas apresentaram sintomatologia característica de podridão gomosa durante os 70 dias em que se realizou o experimento. Nestas duas plântulas assintomáticas provavelmente o patógeno ainda estava em latência. Como o inóculo, em cada semente, é um isolado diferente, nestas plântulas o patógeno provavelmente seria menos agressivo e/ou as condições climáticas não foram favoráveis para o desenvolvimento da doença.

### 3.3. Infecção Sistêmica

No ensaio para a constatação do patógeno em infecção sistêmica nas plantas de meloeiro nobre, o primeiro grupo de fragmentos analisados foram os coletados a partir do tecido sintomático. Todas as amostras de DNA total coletadas destes fragmentos apresentaram resposta positiva para a presença de *D. bryoniae*, através de PCR multiplex com oligonucleotídeos específicos. Das amostras coletadas de fragmentos do caule assintomáticos localizados aos 5cm e 15cm acima da região sintomática, foram obtidas 19 e 14 amostras positivas para a presença de *D. bryoniae*, respectivamente. Já, nas amostras coletadas de regiões assintomáticas localizadas 30cm acima da região sintomática, foi constatada a presença do patógeno em apenas 3 das 20 plantas analisadas (Quadro 3).

**Quadro 3.** Detecção de infecção sistêmica de *Didymella bryoniae* em plantas de meloeiro nobre híbrido Sunrise por PCR multiplex com DNA total extraído de fragmentos de diferentes localizações no caule.

Localização do fragmento na planta	Número de amostras Positivas/Coletadas
Tecido sintomático	20/20
5 cm acima do tecido sintomático	19/20
15 cm acima do tecido sintomático	14/20
30 cm acima do tecido sintomático	3/20

Foram consideradas positivas as amostras de DNA total coletadas dos diferentes fragmentos e que seus produtos de PCR resultaram na amplificação dos dois fragmentos genômicos de 535 pb (UNLO28S22 + D7S) e 461 pb

(UNLO28S22 + D6), sendo comprovada, desta forma, a presença do patógeno *D. bryoniae*. Confirmou-se, a partir da amplificação do DNA total extraído de fragmentos assintomáticos localizados a 5cm, 15cm e 30cm, a hipótese de que o patógeno *D. bryoniae* se desenvolve sistemicamente no interior das plântulas de meloeiro nobre, podendo não exteriorizar seus sinais e provocar sintomas visuais.

De acordo com Koch e Utkhede (2004), um oligonucleotídeo utilizado em cada par do oligonucleotídeos utilizados na detecção de *D. bryoniae* é universal (UNLO28S22) e tem sido usado para amplificação de fungos septados. Já, os oligonucleotídeos D7S e D6 foram desenhados a partir de informações de sequência depositadas no GenBank, específicas para *D. bryoniae*. Cada par de oligonucleotídeos é específico ao nível de gênero, com alguns resultados inespecíficos para *Phoma* ou outras espécies de *Didymella*. No entanto, quando estes pares de oligonucleotídeos foram combinados em um PCR multiplex, só foram obtidos resultados positivos para *D. bryoniae*.

A técnica de PCR, com oligonucleotídeos específicos, apresenta-se como uma alternativa segura, sendo utilizada para várias culturas para detecção de infecção latente como, por exemplo, para detecção de *Phytophthora infestans* nas culturas de batata e tomate a partir de frutos, folhas e tubérculos (TROUT et al., 1997). Tem sido utilizada, também, para detecção de *Puccinia horiana*, agente causal da ferrugem branca do crisântemo, que é um patógeno de quarentena em muitos países (PEDLEY, 2009). Em meloeiro nobre, esta técnica também foi sensível para detectar o patógeno *D. bryoniae* em latência, a partir dos tecidos de caule e folhas cotiledonares de plântulas assintomáticas.

Nos ensaios em que a extração do DNA total foi efetuada do caule das plântulas, houve a destruição das plântulas, o que torna o método para ser aplicado em viveiros de mudas.

No experimento utilizando DNA total extraído das folhas de plântulas obteve-se, na primeira avaliação (1 dia após a emergência), 9 amostras positivas das 80 amostras de folhas cotiledonares avaliadas. No entanto, na segunda avaliação (20 dias após a emergência), foram detectadas 26 amostras positivas para a presença do patógeno nas mesmas plântulas avaliadas

anteriormente. Esta diferença pode ter ocorrido em função do patógeno não ter alcançado os tecidos da folhas cotiledonares em todas as plântulas quando da coleta inicial ou ainda, por estar em quantidade ínfima em relação ao DNA total extraído das folhas, o que não foi amplificado na reação de PCR.

Possivelmente, na primeira avaliação, só foi possível detectar *D. bryoniae* nas plântulas originadas a partir de sementes infectadas com o patógeno nos tecidos cotiledonares. Aos 20 dias após a emergência, com o desenvolvimento das plântulas e também do patógeno, foi possível detectá-lo também nas plântulas originadas de sementes, em que o inóculo estava localizado superficialmente nas mesmas e que anteriormente (primeira coleta), não havia sido detectado. O fungo *D. bryoniae* pode se manter em sementes infectadas, localizando-se superficialmente ou em seu interior, no perisperma e tecidos cotiledonares, sendo detectado, com maior frequência, superficialmente (LEE et al., 1984; SUDISHA et al., 2006).

Quanto às avaliações realizadas com folhas definitivas, mesmo após 60 dias da emergência, não foi possível detectar o patógeno através da técnica de PCR multiplex. Este resultado se mostra como falso negativo, pois, nas plântulas em que se detectou o patógeno nas folhas cotiledonares, observou-se correspondência no surgimento de sintomas característicos de podridão gomosa em casa-de-vegetação. Como os sintomas de podridão gomosa iniciaram-se sempre na região de inserção das folhas cotiledonares, possivelmente *D. bryoniae* não se desenvolveu no interior das plântulas até alcançar os tecidos das folhas definitivas.

Resultados semelhantes foram obtidos nos estudos desenvolvidos por Klingelfuss; Yorinori (2001), que mostraram que os fungos patogênicos à soja, *Colletotrichum truncatum* e *Cercospora kikuchii*, estavam associados com a parte aérea da planta muito antes do aparecimento de sintomas das respectivas doenças. *C. truncatum* estava presente, tanto na folha como nas hastes, desde o estágio R5.2, sem, contudo, apresentar sintomas de antracnose até o final do ciclo. *C. kikuchii* apresentou baixa incidência no estágio R5.2 e progrediu à medida que as plantas se aproximaram da maturação. Da mesma forma, o patógeno *D. bryoniae* progrediu nas plantas de meloeiro nobre infectadas com o desenvolvimento das mesmas.

Tem-se como infecção latente, o 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.

Confirmando o período de latência observado nos ensaios, Gasparotto (2006) observou como período mínimo de latência, 28 dias entre a semeadura e o aparecimento de sintomas em plântulas do híbrido Sunrise. Os sintomas da podridão gomosa apareceram aos 32 e 35 dias para os híbridos Bonus II e Prince Hakucho. Até os sessenta dias após a semeadura houve expressão de sintomas em novas plântulas.

O grande problema da ocorrência de infecção latente de *D. bryoniae* é que as plantas de meloeiro infectadas podem não manifestar sintomas na fase de produção de mudas, dificultando o seu descarte antes do transplante para a estufa. Mudas com infecção latente transplantadas, dentro de 15 dias pós-transplante manifestam sintomatologia de podridão gomosa (GASPAROTTO, 2006). Ainda, segundo o autor, para sementes de meloeiros nobres cultivados no Brasil, a porcentagem de transmissão, dependendo do híbrido, com possível ocorrência de infecção latente, chegaram a 59%. A presença de grande quantidade de inóculo no início do cultivo geralmente resulta em severas epidemias e/ou baixa eficiência de medidas de controle (VIDA et al., 2004; GASPAROTTO, 2006).

A infecção sistêmica é definida como a disseminação do patógeno de um ponto internamente para todo o corpo da planta (AGRIOS, 2005). Neste trabalho, esse tipo de disseminação foi comprovado pela presença de *D. bryoniae* em fragmentos de tecidos coletados a diferentes distâncias do tecido sintomático, através de PCR multiplex com oligonucleotídeos específicos.

Sintomas sistêmicos já haviam sido constatados em cultura de meloeiro nobre, com lesões de até 1 metro de comprimento (Vida e Gasparotto, dados não publicados), mas o desenvolvimento de infecção sistêmica

assintomática ainda não havia sido comprovada. A grande implicação de infecção sistêmica assintomática se deve ao fato da cultura de meloeiro necessitar de muitos tratamentos culturais como desbastes, podas e raleios e que o patógeno pode ser transmitido de uma planta para outra por meio destas operações. É frequente a ocorrência de picos abruptos no progresso da podridão gomosa na cultura de meloeiro nobre após podas das brotações laterais e esse fato tem sido associado à disseminação do patógeno pela ferramenta de poda (VIDA et al., 2004). Em cultura de melancia também ocorrem picos no progresso da podridão gomosa na época de início da colheita dos frutos, quando normalmente ocorrem injúrias nos ramos e nas folhas (SANTOS, 2005).

Diante da constatação da ocorrência de infecção latente e sistêmica de *D. bryoniae* em meloeiro nobre a partir de inóculo originário de sementes, fica evidente o cuidado que se deve ter com a qualidade sanitária das sementes utilizadas e com a realização dos tratamentos culturais desde o início do cultivo.



#### 4. CONCLUSÕES

- O emprego de PCR multiplex permitiu detectar a infecção latente e sistêmica de *D. bryoniae*.
- O patógeno *D. bryoniae* apresenta infecção latente em plântulas de meloeiro nobre.
- O patógeno pode apresentar desenvolvimento sistêmico assintomático em plantas de meloeiro nobre.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**, 5th edition. Elsevier Academic Press, 2005, 922p.
- AMORIM, L. Colonização e Reprodução. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (eds.) **Manual de Fitopatologia – Princípios e Conceitos**. 3ed., v.1, São Paulo: Agronômica Ceres. 1995. p.309-324.
- 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: GOTO, R.; TIVELLI, S. W. **Produção de hortaliças em ambiente protegido: condições subtropicais**. São Paulo: Fundação Editora da UNESP, 1998, p.161- 194.
- CHIU, W. F.; WALKER, J. C. Morphology and variability of the cucurbit black rot fungus. **Journal of Agricultural Research**, v. 78, p. 81-102, 1949.
- 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. 42f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- 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.
- 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.
- KLINGELFUSS, L. H.; YORINORI, J. T. Infecção latente de *Colletotrichum truncatum* e *Cercospora kikuchii* em soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.2, 2001.

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**, v.87, n.9, p.915-923, 1997.

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 of Plant Pathology**, v.26, n.3, 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.

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.

SANTOS, G. R. **Biologia, epidemiologia e manejo do crestamento gomoso do caule da melancia, causado por *Didymella bryoniae***. Brasília: UNB, 232p. (Tese doutorado), 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, p. 196-205, 2006.

TROUT, C. L.; RISTAINO, J. B.; MADRITCH, M.; WANGSOMBOONDEE, T. Rapid detection of *Phytophthora infestans* in late blight-infected potato and tomato using PCR. **Plant Disease**, v. 81, p.1042-1048, 1997.

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.324, 1993.

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: **7º Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes**, 2002, Sete Lagoas/MG. 7º Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes - Resumos e Palestras, p. 79, 2002.

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, p.626-630, 2004.

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

## **CAPÍTULO V**

### **CONTROLE QUÍMICO DA PODRIDÃO GOMOSA E QUALIDADE DOS FRUTOS**

## RESUMO

A podridão gomosa (*Didymella bryoniae*) é a principal doença para a cultura do meloeiro nobre em cultivo protegido e poucos são os fungicidas registrados para o seu controle. A falta de alternância na utilização de princípios ativos vem causando limitações no manejo da doença. Este trabalho objetivou avaliar o controle químico da podridão gomosa na cultura de meloeiro nobre sob estufa plástica, utilizando-se do tratamento de sementes com carbendazim (150g/L) + tiram (350g/L) na dose na dose 0,3 + 0,7g i.a./kg de sementes e pulverização foliar a cada dez dias com o fungicida epoxiconazol (50g/L) + piraclostrobina (133g/L) na dose 0,1 + 0,3g i.a./L além de avaliar a qualidade dos frutos produzidos (teor de sólidos solúveis e peso médio). Foram utilizados os seguintes tratamentos: TP - sementes tratadas e plantas pulverizadas; TNP - sementes tratadas e plantas sem pulverização; NTP - sementes não tratadas e plantas pulverizadas; NTNP - sementes não tratadas e plantas não pulverizadas (testemunha). Aos 93 dias após o transplante, a incidência de podridão gomosa em cada tratamento foi de 40,5%; 51,6%; 59,2% e 65,3% e a severidade da doença foi de 9,1; 11,2; 15,8 e 16,6cm<sup>2</sup> nos tratamentos TP, NTP, TNP e NTNP, respectivamente. Os tratamentos TP e NTP foram os que melhor controlaram a doença. Os teores médios de sólidos solúveis foram de 8,5; 8,6; 9,1 e 10,4 °Brix para os tratamentos NTNP, TNP, NTP e TP, sendo que frutos produzidos nos tratamentos TP e NTP apresentavam-se comercializáveis. O peso médio dos frutos não foi influenciado pelos tratamentos variando de 821,5 a 915 gramas. Os resultados deste trabalho mostraram que o tratamento de semente com carbendazim + tiram associado à pulverização na cultura com o fungicida epoxiconazol + piraclostrobina constituem eficiente estratégia para o controle da podridão gomosa em melão nobre Sunrise cultivado em estufa plástica.

**Palavras-chave:** *Didymella bryoniae*, *Cucumis melo* var. *reticulatus*, tratamento de sementes, pulverização foliar.

## ABSTRACT

**Chemical control of gummy stem blight and quality of fruits.** The gummy stem blight (*Didymella bryoniae*) is a major disease for the muskmelon in greenhouse and there are few fungicides registered for its control. The absence of rotation of active ingredients has caused limitations in the management of the disease, so this study had the objective to evaluate the chemical control of gummy stem blight in the culture of muskmelon under plastic greenhouse, using seed treatment with carbendazim (150 g / L) + thiram (350g/L) at dose of 2mL/kg of seed and foliar spraying every ten days with fungicide epoxiconazol (50 g / L) + pyraclostrobin (133 g / L) at concentration of 0,2mL/L and evaluate the quality of fruits produced. It was used the following treatments: TP - treated seed and sprayed plants; NPT - treated seeds and plants without spraying NTP - untreated seeds and plants sprayed; NTNP - untreated seeds and plants not sprayed (control). At 93 days after transplantation, the incidence of gummy stem blight in each treatment was 40,5; 51,6; 59,2 and 65,3% and the severity of gummy stem blight was 9,1; 11,2; 15, 8 and 16,6 cm<sup>2</sup> in treatment TP, NTP, NPT and NTNP respectively. The treatments TP and NTP were significantly different from the other at 5% of probability. The average content of soluble solids were 8,5; 8,6; 9,1 and 10,4 ° Brix for treatments NTNP, TNP, NTP and TP, and fruits produced in the treatments TP and NTP were marketable. The results of this study showed that seed treatment with carbendazim + thiram in the culture associated with the spraying with the fungicide pyraclostrobin + epoxiconazole constitute an efficient strategy on control of gummy stem blight in Sunrise muskmelon grown in plastic greenhouses.

**Keywords:** *Didymella bryoniae*, *Cucumis melo* var. *reticulatus*, seed treatment, foliar spray.

## 1. INTRODUÇÃO

O cultivo de melão rendilhado (*Cucumis melo* var. *reticulatus*) no Brasil teve seu primeiro registro para fins comerciais em 1986, pela Cooperativa Agrícola de Cotia, com sementes importadas do Japão (RIZZO, 1999). Desde então, esta hortaliça tem sido muito apreciada e de consumo ascendente no Brasil. Devido à necessidade de uso de alta tecnologia para obtenção de frutos de qualidade, no Paraná cultiva-se, principalmente, em ambiente protegido, tipo estufas plásticas (BRANDÃO FILHO; CALLEGARI, 1999).

Dos fatores limitantes à produção desta cultura, as doenças provocam danos e redução na produtividade e na qualidade dos frutos, além de elevar o custo de produção com o uso de defensivos. Dentre elas, o crestamento gomoso do caule causado por *Didymella bryoniae* (Auersw) Rehm, anamorfo *Ascochyta cucumis* Fautrey & Roum [= *Phoma cucurbitacearum* (Fr.) Sacc.] é a principal doença fúngica do meloeiro nobre sob ambiente protegido (VIDA et al. 2004), com freqüentes 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).

Em cultivo protegido, a podridão gomosa ocorre com maior intensidade quando se compara ao cultivo convencional e é condicionada por efeitos diretos, do ambiente aéreo e do solo sobre o patógeno, e indiretos, que se dá através de mudanças fisiológicas e anatômicas nas plantas hospedeiras. Ainda, em cultivo protegido há uso de híbridos de melão, com alta suscetibilidade ao patógeno (VAN STEEKELENBURG, 1983; VIDA et al., 2001).

Os primeiros sintomas da doença ocorrem na superfície do colo da planta, na forma de finas rachaduras que, em seguida, necrosam e apodrecem o colo e os ramos, provocando a murcha, a seca das folhas e a morte da planta. Nitidamente são observados exsudados sobre as necroses das áreas afetadas. (WIANT, 1945; CHIU; WALKER, 1949; LEE et al., 1984; SUDISHA et al. 2006; GASPAROTTO et al., 2009).



*D. bryoniae* pode sobreviver em restos de cultura na forma de micélio dormente, sendo bastante resistente às condições de estresse, principalmente, ao dessecamento. Assim, os resíduos culturais não decompostos podem servir como fonte de inóculo por mais de um ano (VAN STEEKELENBURG, 1983; KEINATH, 2002; 2008; SHTIENBERG et al., 2005). Um aspecto importante da doença é o fato do seu agente causal ser naturalmente transmitido pela semente, que geralmente serve como fonte de inóculo primário para as infecções em culturas de cucurbitáceas (LEE et al., 1984; SUDISHA et al., 2006; GASPAROTTO et al., 2009). O uso de sementes livres do patógeno ou o tratamento de sementes se tornam estratégias importantes para a sanidade da cultura.

Cultivares comerciais de cucurbitáceas resistentes à *D. bryoniae*, principalmente híbridos de meloeiro nobre, praticamente inexistem, apesar do relato de várias fontes de resistência em cucurbitáceas (MCGRATH et al., 1993; SUMNER; HALL, 1993; WEHNER; AMAND, 1993; DIAS et al., 1996; ZHANG et al., 1997; TSUTSUMI; SILVA, 2004; GUSMINI et al., 2005).

Desta forma, o controle da podridão gomosa tem sido feito principalmente com o uso fungicidas (KEINATH, 1995). Poucos são os fungicidas registrados para o controle da podridão gomosa em cucurbitáceas e a falta de alternância na utilização de princípios ativos vem causando limitações no manejo da doença. Trabalhos desenvolvidos em diferentes regiões do mundo relataram a resistência de isolados deste patógeno a determinados princípios ativos como os benzimidazóis (MALATHRAKIS; VAKALOUNAKIS, 1983; VAN STEEKELENBURG, 1987; KEINATH; ZITTER, 1998; KEINATH, 2009). No Brasil, Santos et al. (2006) detectaram a existência de resistência de isolados de *Didymella 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.

No Brasil, existem poucos estudos sobre o controle químico desta doença em meloeiro nobre e, em ambiente protegido, estes são ainda mais raros. Por isso, este trabalho objetivou avaliar o controle químico da podridão gomosa na cultura de meloeiro nobre sob estufa plástica, utilizando-se do tratamento de sementes com carbendazim + tiram e de pulverização foliar com epoxiconazol + piraclostrobina e avaliar a qualidade dos frutos produzidos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio experimental foi desenvolvido em estufa plástica tipo túnel alto, localizada no Centro Tecnológico de Irrigação, pertencente ao Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá.

### 2.1. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, constituído por quatro tratamentos, seis repetições e parcela útil composta por 12 plantas. Os tratamentos avaliados para o controle da podridão gomosa em estufa plástica foram:

- Tratamento 1 - Plantas originadas de sementes tratadas com carbendazim (150 g/L) + tiram (350 g/L) na dose 0,3 + 0,7g i.a./kg de sementes e pulverizadas a cada dez dias com o fungicida epoxiconazol (50 g/L) + piraclostrobina (133 g/L) na dose 0,1 + 0,3g i.a./L (TP);
- Tratamento 2 - Plantas originadas de sementes tratadas com carbendazim (150 g/L) + tiram (350 g/L) 0,3 + 0,7g i.a./kg de sementes (TNP);
- Tratamento 3 - Plantas originadas de sementes não tratadas e pulverizadas a cada dez dias com o fungicida epoxiconazol (50 g/L) + piraclostrobina (133 g/L) na dose 0,1 + 0,3g i.a./L;
- Tratamento 4 - Plantas originadas de sementes não tratadas e não pulverizadas (testemunha) (NTNP).

### 2.2. Produção de mudas

Para a instalação da cultura de meloeiro nobre em estufa plástica foram utilizadas sementes do híbrido Sunrise, adquiridas em estabelecimento de comercialização de sementes da cidade de Maringá-PR.

As sementes utilizadas nos tratamentos 1 (TP) e 2 (TNP) foram tratadas com o fungicida carbendazim (150 g/L) + tiram (350 g/L) na dose 0,3 + 0,7g i.a./kg de sementes e, então, colocadas para pré-germinar entre folhas de papel germitest umedecidas com água destilada em germinador à temperatura

de 28°C. As sementes dos tratamentos 3 (NTP) e 4 (NTNP) foram colocadas diretamente para pré-germinar entre folhas de papel germitest umedecidos com água destilada, em germinador à temperatura de 28°C. Após 36 horas, ocorreu a emissão da radícula. As sementes foram, então, semeadas em bandejas de poliestireno de 128 células, contendo substrato comercial Plant Max HF. As bandejas contendo as plântulas foram mantidas em casa-de-vegetação semiclimatizada por 28 dias, até o transplante para estufa plástica.

### **2.3. Instalação da Cultura**

As plântulas de melão foram transplantadas para solo em estufa plástica tipo túnel alto, coberta com polietileno de alta densidade (150 µm). O espaçamento utilizado foi de 0,3 m entre plantas dentro da linha e de 1,0 metro entre linhas.

O solo foi previamente corrigido com calcário calcítico, de acordo com análise prévia, elevando-se a saturação de bases (V%) para 80%. Como adubação de base foram utilizados 2,0 litros de composto orgânico, aplicados 30 dias antes do transplante. Um dia antes do transplante o solo foi adubado com 7,2g de cloreto de potássio, 53g de superfosfato simples e 13g de uréia por metro linear de sulco de cultivo. Após 25 dias do transplante, foi realizada adubação de cobertura com 13g de uréia por metro linear de sulco de cultivo.

Para instalação e condução da cultura foram empregadas as técnicas recomendadas por Brandão Filho e Vasconcellos (1998). As plantas foram conduzidas com haste única, tutoradas na vertical, com fitilho plástico sendo retirados todos os brotos até o 11º entrenó. Nos entrenós 12º, 13º, e 14º foram deixadas as hastes secundárias, onde foram formadas as flores/frutos. Nestas hastes foram retirados todos os brotos que surgiram e foi feita a poda uma folha após o fruto. Nos próximos entrenós do caule continuou-se a retirar todos os brotos até o vigésimo. Nos entrenós 21º, 22º, 23º foi deixado crescer a haste secundária e então se realizou a capação da planta. Nestas hastes secundárias foram deixadas crescer uma nova brotação em cada uma delas (hastes terciárias), uma folha após o surgimento desta haste terciária realizou-se a capação. Estas três hastes terciárias tiveram crescimento livre. Ao final,

foram deixadas, por planta, apenas duas hastes secundárias, com um fruto por haste por planta. Os frutos foram envolvidos em uma rede para evitar a queda dos mesmos quando da maturação fisiológica (Figura 1).



**Figura 1.** Planta de meloeiro nobre conduzida em haste única com dois frutos.

Após a instalação da cultura foram realizadas capinas manuais e a aplicação dos inseticidas tiametoxam (0,5g i.a./L), imidaclopride (1,2g i.a./L) e dissulfan (1,1g i.a./L) para controle de pragas. Para pulverização das plantas com os inseticidas e nos tratamentos pulverizados com 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 até se obter a máxima cobertura da área foliar. As pulverizações com o fungicida iniciaram-se uma semana após o transplante, sendo realizadas

a cada 10 dias até 10 dias antes da colheita. Utilizou-se irrigação localizada com o uso de tubo de gotejo em um turno.

#### **2.4. Avaliações e análise dos resultados**

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, o peso médio dos frutos (kg) e o teor de sólidos solúveis dos frutos produzidos em cada tratamento.

A incidência da podridão gomosa em cada tratamento foi avaliada através 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 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 média das duas dimensões, 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 do Programa AACPD.

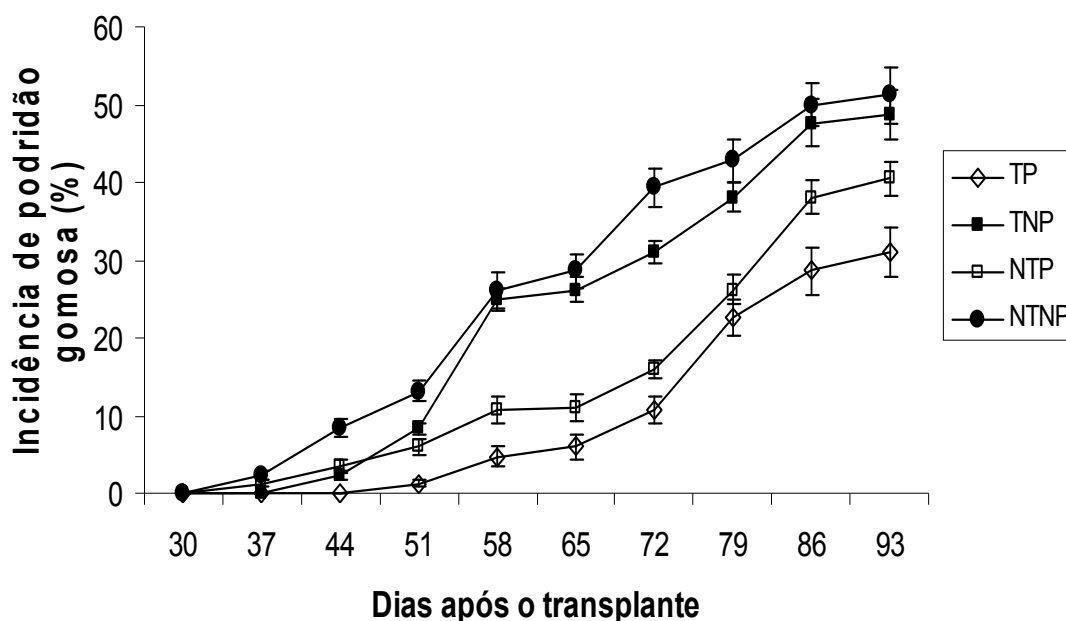
Em cada tratamento foi avaliado o teor de sólidos solúveis totais (SS) dos frutos produzidos. A variável foi determinada para cada fruto em refratômetro digital portátil, Pocket PAL-1, Atago, com resultado expresso em graus Brix. Primeiramente retirou-se uma fatia dos frutos, com aproximadamente cinco centímetros de largura, no sentido longitudinal. Do material cortado, foram retiradas as sementes e a polpa. A polpa foi então triturada num processador doméstico de alimentos. O material resultante foi filtrado em tecido de nylon e, utilizando-se três gotas do suco obtido, foi determinado o SS. Os resultados foram expressos pela média de °Brix em

cada tratamento. Foi avaliado um fruto por planta, de todas as plantas em cada tratamento.

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

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os primeiros sintomas da doença surgiram aos trinta e sete dias após o transplante (DAT) das mudas para o solo da estufa. Estes foram detectados em plantas dos tratamentos 3 (NTP) e 4 (NTNP), nos quais não se realizou o tratamento das sementes (Figura 2). Aos 44 dias, detectou-se sintomas de podridão gomosa em plantas de todos os tratamentos evidenciando que o tratamento das sementes com carbendazim (150g/L) + tiram (350g/L) na dose 0,3+0,7g i.a./kg de sementes não foi eficiente na erradicação do patógeno *D. bryoniae* associado às sementes de meloeiro nobre. Porém, o tratamento das sementes reduziu o inóculo inicial e causou atraso no aparecimento de sintomas da doença nas plantas no campo.



**Figura 2.** Incidência de podridão gomosa em meloeiro nobre (híbrido Sunrise) em estufa plástica sob os tratamentos: **TP** - plantas originadas de sementes tratadas com carbendazim (150g/L) + tiram (350g/L) na dose 0,3+0,7g i.a./kg de sementes e pulverizadas a cada dez dias com o fungicida epoxiconazol (50g/L) + piraclostrobina (133g/L) na dose 0,1 + 0,3g i.a./L; **TNP** - plantas originadas de sementes tratadas com carbendazim (150g/L) + tiram (350g/L) na dose 0,3+0,7g i.a./kg de sementes; **NTP** - plantas originadas de sementes não tratadas e pulverizadas a cada dez dias com o fungicida epoxiconazol (50g/L) + piraclostrobina (133g/L) na dose 0,1 + 0,3g i.a./L; **NTNP** - plantas originadas de sementes não tratadas e não pulverizadas (testemunha).



O tratamento testemunha NTNP (sementes não tratadas e plantas não pulverizadas com fungicida) apresentou maior porcentagem de incidência de podridão gomosa e o tratamento TP (sementes tratadas e plantas pulverizadas) menor incidência. Estes resultados evidenciam o efeito positivo do tratamento de sementes associado à pulverização na redução da incidência de podridão gomosa em meloeiro nobre.

Inicialmente, o tratamento NTP (sementes não tratadas e plantas pulverizadas) apresentou maior incidência de podridão gomosa em comparação ao tratamento TNP (sementes tratadas e plantas não pulverizadas), mas, a partir dos 44 dias, essa situação se inverteu (Figura 2), e, a partir desta data, o tratamento TNP apresenta maior incidência de podridão gomosa que NTP, até o fim do experimento. Este fato demonstra que inicialmente, o tratamento de sementes apresentou efeito na redução do inóculo das plantas do tratamento TNP, mas, a partir dos 44 dias, como este tratamento não foi pulverizado com o fungicida epoxiconazol + piraclostrobina, a doença se disseminou rapidamente entre as plantas em comparação ao tratamento NTP. A pulverização foliar das plantas com o fungicida epoxiconazol + piraclostrobina resultou em menor disseminação da podridão gomosa entre as plantas dos tratamentos pulverizados.

Aos 93 dias após o transplante, a incidência de podridão gomosa em cada tratamento foi de 40,5%; 51,6%; 59,2% e 65,3% para os tratamentos TP, NTP, TNP e NTNP, respectivamente (Quadro 1). Ficou evidente o gradiente de doença entre os tratamentos, sendo que os tratamentos TP e NTP apresentaram menor porcentagem de plantas com podridão gomosa, diferindo dos tratamentos TNP e NTNP. Estes resultados ressaltaram, mais uma vez, a eficiência da pulverização foliar com o fungicida epoxiconazol + piraclostrobina na redução da incidência de podridão gomosa em plantas de meloeiro nobre.

**Quadro 1.** Incidência (%) e severidade (área média) da podridão gomosa no caule de plantas de meloeiro nobre do híbrido Sunrise, após 93 dias do transplante.

Tratamentos <sup>1</sup>	Incidência (%)	Severidade (cm <sup>2</sup> )
<b>NTNP</b>	65,3a <sup>2</sup>	16,6a
<b>TNP</b>	59,2a	15,8a
<b>NTP</b>	51,6b	11,2b
<b>TP</b>	40,5b	9,1b
<b>CV (%)</b>	23,20	32,87

<sup>1</sup> Tratamentos: **TP** - plantas originadas de sementes tratadas com carbendazim (150g/L) + tiram (350g/L) na dose 0,3+0,7g i.a./kg de sementes e pulverizadas a cada dez dias com o fungicida epoxiconazol (50g/L) + piraclostrobina (133g/L) na dose 0,1 + 0,3g i.a./L; **TNP** - plantas originadas de sementes tratadas com carbendazim (150g/L) + tiram (350g/L) na dose 0,3+0,7g i.a./kg de sementes; **NTP** - plantas originadas de sementes não tratadas e pulverizadas a cada dez dias com o fungicida epoxiconazol (50g/L) + piraclostrobina (133g/L) na dose 0,1 + 0,3g i.a./L; **NTNP** - plantas originadas de sementes não tratadas e não pulverizadas (testemunha).

<sup>2</sup>Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott, em nível de 5% de probabilidade.

Os sintomas iniciaram-se, na maioria das plantas, no caule, próximo às folhas cotiledonares senescentes, como lesões inicialmente aquosas e que, posteriormente, se tornaram necróticas, com coloração palha clara. As lesões cresciam longitudinalmente e transversalmente e, em muitas plantas, ocorria o fendilhamento do caule. Também foi constatada a ocorrência de exsudação de goma e, nos tecidos com sintomas mais velhos, ocorreu à formação de numerosos corpos de frutificação negros (picnídios/conídios e pseudotécios com ascas e ascósporos) (Figura 3). Sintomas semelhantes foram descritos por Wiant (1945), Chiu e Walker (1949) e Gasparotto (2006) em infecções por podridão gomosa em cucurbitáceas.

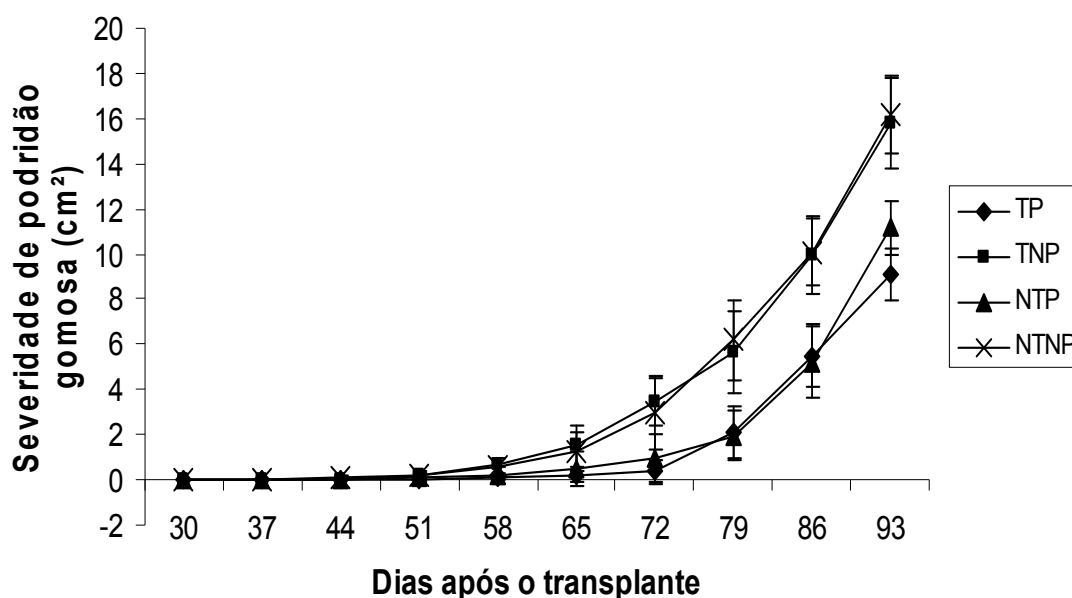
A severidade da podridão gomosa aos 93 dias após o transplante foi maior nas plantas dos dois tratamentos onde não foi realizada a aplicação da mistura epoxiconazol + piraclostrobina (NTNP e TNP), diferindo significativamente dos tratamentos em que foi realizada a pulverização a cada

dez dias (TP e NTP). A severidade de podridão gomosa foi de 9,1; 11,2; 15,8 e 16,6 cm<sup>2</sup> nos tratamentos TP, NTP, TNP e NTNP, respectivamente (Quadro 1).

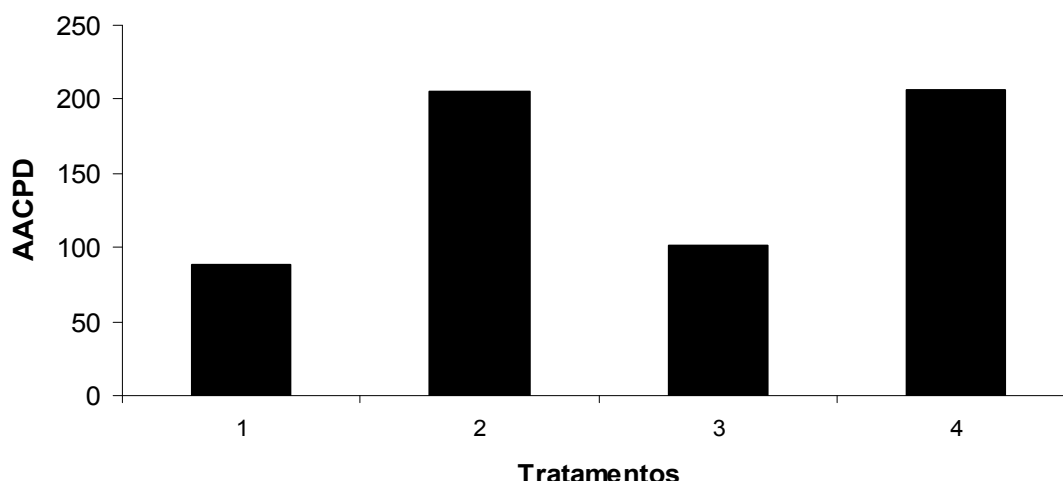


**Figura 3.** Plantas de meloeiro nobre híbrido Sunrise apresentando sintomas e sinais de podridão gomosa na região das folhas cotiledonares senescentes.

Pela curva de progresso da podridão gomosa (Figura 4), observou-se que, a partir dos 51 dias após o transplante, foi possível distinguir dois grupos de plantas com severidade diferenciada de podridão gomosa. Plantas com maior severidade e com curvas de desenvolvimento da doença muito semelhantes nos tratamentos em que não foi realizada a pulverização com a mistura epoxiconazol + piraclostrobina (NTNP e TNP) e plantas em que a doença evoluiu com menor intensidade, nos tratamentos onde foi realizado o controle com o fungicida a cada 10 dias. Estes resultados se refletiram na área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) que foi maior no tratamento testemunha NTNP, seguido pelos tratamentos TNP, NTP e TP (Figura 5).



**Figura 4.** Severidade podridão gomosa em plantas meloeiro nobre (híbrido Sunrise) sob estufa plástica nos tratamentos: **TP** - plantas originadas de sementes tratadas com carbendazim (150g/L) + tiram (350g/L) na dose 0,3+0,7g i.a./kg de sementes e pulverizadas a cada dez dias com o fungicida epoxiconazol (50g/L) + piraclostrobina (133g/L) na dose 0,1 + 0,3g i.a./L; **TNP** - plantas originadas de sementes tratadas com carbendazim (150g/L) + tiram (350g/L) na dose 0,3+0,7g i.a./kg de sementes; **NTP** - plantas originadas de sementes não tratadas e pulverizadas a cada dez dias com o fungicida epoxiconazol (50g/L) + piraclostrobina (133g/L) na dose 0,1 + 0,3g i.a./L; **NTNP** - plantas originadas de sementes não tratadas e não pulverizadas (testemunha).



**Figura 5.** Área abaixo da curva de progresso da podridão gomosa (AACPD) em plantas de meloeiro nobre de acordo com os tratamentos: **TP** - plantas originadas de sementes tratadas com carbendazim (150g/L) + tiram (350g/L) na dose 0,3+0,7g i.a./kg de sementes e pulverizadas a cada dez dias com o fungicida epoxiconazol (50g/L) + piraclostrobina (133g/L) na dose 0,1 + 0,3g i.a./L; **TNP** - plantas originadas de sementes tratadas com carbendazim (150g/L) + tiram (350g/L) na dose 0,3+0,7g i.a./kg de sementes; **NTP** - plantas originadas de sementes não tratadas e pulverizadas a cada dez dias com o fungicida epoxiconazol (50g/L) + piraclostrobina (133g/L) na dose 0,1 + 0,3g i.a./L; **NTNP** - plantas originadas de sementes não tratadas e não pulverizadas (testemunha).

Apesar da diferença, entre os tratamentos quanto a severidade e incidência de podridão gomosa, nenhuma diferença foi observada no peso médio dos frutos produzidos. Os valores encontrados foram 899,3; 878,3; 915,0 e 821,5 gramas nos tratamentos TP, NTP, TNP e NTNP, respectivamente (Quadro 2).

Os teores médios de sólidos solúveis foram de 8,5; 8,6; 9,1 e 10,4 °Brix para os tratamentos NTNP, TNP, NTP e TP (Quadro 2). Os maiores valores de sólidos solúveis foram encontrados no tratamento TP, onde ocorreu menor severidade de podridão gomosa. É importante ressaltar que, apesar do tratamento NTP não ser significativamente diferente dos tratamentos TNP e NTNP quanto ao valor de sólido solúveis dos frutos, este tratamento produziu frutos considerados como comercializáveis enquanto os outros dois tratamentos produziram frutos apresentando sólidos solúveis abaixo do que

exigido para comercialização. Segundo Protade (1995), frutos apresentando Brix abaixo de 9° são frutos não comerciáveis.

**Quadro 2.** Peso e teor de sólidos solúveis de frutos de meloeiro nobre híbrido Sunrise, após 93 dias do transplante.

Tratamentos <sup>1</sup>	Peso dos frutos (g)	Brix
NTNP	821,5 <sup>a</sup>	8,5b
TNP	915,0a	8,6b
NTP	878,3 <sup>a</sup>	9,1b
TP	899,3 <sup>a</sup>	10,4 <sup>a</sup>
CV (%)	8,44	8,47

<sup>1</sup> Tratamentos: **TP** - plantas originadas de sementes tratadas com carbendazim (150g/L) + tiram (350g/L) na dose 0,3+0,7g i.a./kg de sementes e pulverizadas a cada dez dias com o fungicida epoxiconazol (50g/L) + piraclostrobina (133g/L) na dose 0,1 + 0,3g i.a./L; **TNP** - plantas originadas de sementes tratadas com carbendazim (150g/L) + tiram (350g/L) na dose 0,3+0,7g i.a./kg de sementes; **NTP** - plantas originadas de sementes não tratadas e pulverizadas a cada dez dias com o fungicida epoxiconazol (50g/L) + piraclostrobina (133g/L) na dose 0,1 + 0,3g i.a./L; **NTNP** - plantas originadas de sementes não tratadas e não pulverizadas (testemunha).

<sup>2</sup>Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott, em nível de 5% de probabilidade.

Diante destes resultados, evidencia-se a interferência da podridão gomosa na qualidade dos frutos de meloeiro nobre, principalmente em relação ao teor de sólidos solúveis, bem como a importância do controle químico para a qualidade dos frutos produzidos. Resultados semelhantes foram obtidos por Vawdrey (1994), testando diferentes fungicidas no controle da podridão gomosa em meloeiro, que obteve teor de sólidos solúveis totais significativamente maior nos tratamentos com menor intensidade da doença. Diferente do encontrado neste trabalho, Vawdrey (1994) observou que, para todos os produtos químicos testados, ocorreu aumento significativo do peso de frutos comerciais, e que todas as substâncias fungicidas, exceto mancozeb, produziram aumento significativo no número de frutos comerciais.

O patógeno *D. bryoniae* reduziu o peso total de frutos de melancia, o teor de sólidos solúveis e o percentual de frutos com teor de sólidos solúveis superior a 10% em comparação com tratamentos com menor intensidade de podridão gomosa proporcionada pela aplicação dos fungicidas mancozeb e clorotalonil (KEINATH, 2001). O mesmo autor verificou que os teores de sólidos solúveis não diferiram entre os tratamentos com mancozeb ou clorotalonil no experimento.

O controle químico da doença não é facilmente obtido durante os períodos de alta umidade e precipitação, que são favoráveis para o desenvolvimento da doença (SCHENCK 1968; VAN STEEKELENBURG; VAN DE VOOREN, 1980). Neste experimento, mesmo em condições de alta umidade, o tratamento de sementes com carbendazim + tiram reduziu o inóculo inicial e as pulverizações a cada dez dias com a mistura piraclostrobina + epoxiconazol, proporcionaram redução na taxa de progresso da doença, observando-se significativo controle.

O fungicida utilizado na pulverização das plantas apresenta duplo modo de ação, atuando através do ingrediente ativo epoxiconazol como inibidor da biosíntese do ergosterol, um constituinte da membrana celular dos fungos e através do ingrediente ativo piraclostrobina, como inibidor do transporte de elétrons nas mitocôndrias das células dos fungos, inibindo a formação de ATP essencial nos processos metabólicos desses microrganismos. Assim, o fungicida apresenta excelente ação protetiva devido a sua atuação na inibição da germinação dos esporos, desenvolvimento e penetração dos tubos germinativos. Ainda, apresenta ação curativa e erradicante, de ação sistêmica. Acrescenta-se que podem ocorrer efeitos fisiológicos positivos na fisiologia das plantas, como o incremento da produtividade ou na qualidade do produto final.

O efeito fisiológico proporcionado por produtos à base de estrobilurina se traduz em aumento da fotossíntese líquida e da atividade da enzima nitrato-reductase, combinado com a redução da produção de etileno. Assim, as plantas acumulam mais energia, que é dirigida à respiração. Quanto maior o saldo, maior o desenvolvimento e, conseqüentemente mais saudável a planta será. Já, o aumento de atividade da enzima nitrato-reductase resulta em maior

produção de proteínas, fundamentais para a boa nutrição das plantas. A redução da síntese de etileno se traduz na diminuição da queda antecipada das folhas, proporcionando atividade foliar mais prolongada. O benefício do efeito fisiológico é visualizado pelo maior porte das plantas e a folhagem bem mais verde (VENÂNCIO et al., 2004).

Com a aplicação da estrobilurina neste experimento, ocorreu 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, juntamente com o efeito fungicida do produto aplicado. Em plantas de meloeiro nobre de diferentes híbridos, Gasparotto (2006) relacionou o início dos sintomas de podridão gomosa com a senescência das folhas cotiledonares destas plantas.

Para Venâncio et al. (2005), os fungicidas 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).

Sob condições ambientais favoráveis, a não utilização de fungicidas com alguma atividade curativa para a podridão gomosa ocasiona perdas significativas nas culturas de melancia e melão (KEINATH, 2000; VAWDREY, 1994). 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 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).

No Brasil, estudo in vitro desenvolvido por Santos et al. (2006), detectaram a resistência de isolados de *D. bryoniae* a tiofanato metílico, carbendazim e a mistura tiofanato metílico + clorotalonil. Os autores relataram,



porém, que *D. bryoniae* apresentou sensibilidade a triazóis (difenoconazole, tebuconazole), estrobirulinas em misturas com triazóis (trifloxistrobina + propiconazole), ao grupo ditiocarbamato em mistura com triazóis ou ditiocarbamato utilizado isoladamente.(mancozebe + difenoconazole, mancozebe, respectivamente).

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.

Neste estudo, o efeito da mistura piraclostrobina+epoxiconazole na contenção do tamanho das lesões provocadas pelo patógeno *D. bryoniae* indica que estes fungicidas foram ativos, tanto na prevenção da infecção quanto na limitação do crescimento micelial de *D. bryoniae*. Além disso, os princípios ativos utilizados podem afetar várias fases do ciclo de vida do fungo.

No tratamento no qual foi realizado o tratamento de sementes e a pulverização com fungicida (TP) houve redução significativa tanto na incidência da doença, quanto na área das lesões e, também, no maior teor de sólidos solúveis nos frutos produzidos. Isso mostra que a associação do tratamento de sementes com pulverizações no campo é importante para o manejo da podridão gomosa.

Os resultados deste trabalho mostraram que o tratamento de semente com carbendazim + tiram associado à pulverização na cultura com o fungicida epoxiconazol + piraclostrobina constituem em eficiente estratégia para o controle da podridão gomosa em melão nobre Sunrise cultivado em estufa plástica.

#### 4. CONCLUSÕES

- O tratamento de sementes com carbendazim (150g/L) + tiram (350g/L), na dose 0,3+0,7g i.a./kg de sementes, não erradicou o patógeno *D. bryoniae* das sementes de meloeiro nobre, mas possibilitou atraso no aparecimento de sintomas de podridão gomosa.
- A pulverização das plantas na estufa com o fungicida epoxiconazol (50g/L) + piraclostrobina (133g/L), na dose 0,1 + 0,3g i.a./L, foi eficiente na redução da incidência e da severidade de podridão gomosa em plantas de meloeiro nobre híbrido Sunrise sob estufa plástica.
- Frutos de meloeiro produzidos nos tratamentos em que as plantas foram pulverizadas apresentaram melhor qualidade quanto ao teor sólidos solúveis do que os produzidos nos demais tratamentos, sendo considerados comercializáveis.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRANDÃO FILHO, J. U. T., VASCONCELLOS, M. A. S. A cultura do meloeiro. In: GOTO, R., TIVELLI, S. W. **Produção de hortaliças em ambiente protegido**: condições subtropicais. São Paulo: Fundação Editora da UNESP, 1998, p.161-194.

BRANDÃO FILHO, J. U. T.; CALLEGARI, O. Cultivo de hortaliças em solo em ambiente protegido. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, p. 64-68, 1999.

CHIU, W. F.; WALKER, J. C. Morphology and variability of the cucurbit black rot fungus. **Journal of Agricultural Research**, v. 78, p. 81-102, 1949.

DIAS, R. C. S.; QUEIROZ, M. A.; MENEZES, M. Identificação de fontes de resistência em melancia a *Didymella bryoniae*. **Horticultura Brasileira**, v.14, p.15-17, 1996.

FERREIRA, D. F. **Sisvar**: Sistema para análise de variância para dados balanceados versão 4.2. Lavras: UFLA, 2003.

GASPAROTTO F. **Avaliação da sanidade de sementes de híbridos de meloeiro nobre indicados para cultivo protegido**. Maringá: UEM, 42p (Tese Mestrado), 2006.

GASPAROTTO, F.; VIDA, J. B.; TESSMANN, D. J.; BONALDO, S. M.; AGUIAR, R. L.; PENHARBEL, M. P. Eficiência de métodos para detecção de *Didymella bryoniae* associado a sementes de híbridos de meloeiros nobres. **Acta Scientiarum-Agronomy**, v.31, p.397-402, 2009.

GUSMINI, G.; SONG, R.; WEHNER, T.C. New sources of resistance to gummy stem blight in watermelon. **Crop Science**, v. 45, p. 582-588, 2005.

KEINATH, A.P. Fungicide timing for optimum management of gummy stem blight epidemics on watermelon. **Plant Disease**, v.79, p.354-358, 1995.

KEINATH, A. P.; ZITTER, T. A. Resistance to benomyl and thiophanate-methyl in *Didymella bryoniae* from South Carolina and New York. **Plant Disease**, v. 82; p. 479-484, 1998.

KEINATH, A. P. Effect of protectant fungicide application schedules on gummy stem blight epidemics and marketable yield of watermelon. **Plant Disease**, v. 84, p. 254–260, 2000.

KEINATH, A. P. Effect of fungicide applications scheduled to control gummy stem blight on yield and quality of watermelon fruit. **Plant Disease**, v. 85, p. 53-58, 2001.

KEINATH, A. P. Survival of *Didymella bryoniae* in buried watermelon vines in South Carolina. **Plant Disease**, v. 86, p. 32-38, 2002.

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. Survival of *Didymella bryoniae* in infested muskmelon crowns in South Carolina. **Plant Disease**, v. 92, p. 1223-1228, 2008.

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.

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.

MCGRATH, D.J.; VAWDREY, L.; WALKER, I.O. Resistance to gummy stem blight in muskmelon. **Hort Science**. v.28, p.930-931, 1993.

PROTADE. **Melons-export manual**: tropical fruits and vegetables. Eschborn: GTZ, 1995. 36p.

RIZZO, A.A.N. **Avaliação de caracteres agronômicos e qualitativos de cinco cultivares de melão rendilhado (*Cucumis melo* var. *reticulatus* Naud.) e da heterose de seus híbridos F1**. Jaboticabal, 1999. 61p. (Dissertação mestrado), FCAV/UNESP.

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.

SCHENCK, N. C. Epidemiology of gummy stem blight (*Mycosphaerella citrullina*) on watermelon: ascospore incidence and disease development. **Phytopathology**, v. 58, p. 1420-1422, 1968.

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, p. 196-205, 2006.

SUMNER, D.R.; HALL, M.R. Resistance of watermelon cultivars to *Fusarium* wilt and gummy stem blight. **Biologic Cultural Tests**, v.8, p.36, 1993.

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

UTKHEDE, R.S.; KOCH, C.A. Chemical and biological treatments for control of gummy stem blight of greenhouse cucumbers. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 443–448, 2002.

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.

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.

VAN STEEKELENBERG, N. A. M.; VAN DE VOOREN J. Influence of the glasshouse climate on development of diseases in cucumber crop with special reference to stem and fruit rot caused by *Didymella bryoniae*. **Acta Horticulturae**, v. 118, p. 45-56, 1980.

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**, Netherlands, v.91, p.253-264, 1983.

VAN STEEKELENBURG, N. A. M. Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in *Botrytis cinerea* and *Didymella bryoniae* in cucumbers in the Netherlands. **Med. Fac. Landbouww**, v.52, p.875-880, 1987.

VENANCIO, 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.

VENANCIO, 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.

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

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, p.626-631, 2004.

ZHANG, Y. P.; KYLE, M.; ANAGNOSTOU, K.; ZITTER, T.A. Screening melon (*Cucumis melo*) for resistance to gummy stem blight in the greenhouse and field. *HortScience*, v.32, p. 117-121, 1997.

WEHNER, T. C.; AMAND, P. C. Field tests for cucumber resistance to gummy stem blight in North Carolina. **HortScience**, v.28, p.327-329, 1993.

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

## **CAPÍTULO VI**

### **EFEITO DA ENXERTIA NO CONTROLE DA PODRIDÃO GOMOSA EM MELOEIRO NOBRE**

## RESUMO

A podridão gomosa (*Didymella bryoniae*) é uma doença muito importante para a cultura do melão, podendo causar prejuízos de até 100% na produção. Embora o controle dessa doença seja efetuado, basicamente, com fungicidas, medidas alternativas de controle associadas, como a enxertia, poderiam ser benéficas em sistemas de manejo integrado. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da enxertia no controle da podridão gomosa em plantas de melão nobre enxertadas em abóbora imune à *D. bryoniae*. Em casa-de-vegetação, plantas de melão do híbrido Sunrise, enxertadas em abóbora Shelper foram inoculadas no caule do enxerto (copa), na região da união do porta-enxerto com a copa e no caule do porta-enxerto. O caule de plantas pé-franco de meloeiro e de abóbora Shelper também foram inoculados. Em estufa plástica, foi avaliado o desenvolvimento da podridão gomosa, com inóculo inicial oriundo de sementes, nos híbridos Sunrise, Bonus II, Louis e Prince Hakucho, enxertados em abóbora Shelper. Em casa-de-vegetação, houve significativa redução da área das lesões de podridão gomosa nas plantas de melão Sunrise enxertadas em abóbora Shelper, com inoculação no caule do enxerto (42,6 cm<sup>2</sup>) e na região da enxertia (27,5 cm<sup>2</sup>), em relação às plantas pé-franco do enxerto (64,3 cm<sup>2</sup>). No caule do porta-enxerto não ocorreu sintomas da doença. Em estufa plástica, também houve significativa redução de área das lesões da doença em plantas enxertadas, para Sunrise, Louis e Prince Hakucho, as áreas de lesões foram de 23,5; 11,6 e 11,9 cm<sup>2</sup>, respectivamente. Para plantas pé-franco dos mesmos híbridos, as áreas das lesões foram de 35,8, 21,2 e 22,5 cm<sup>2</sup>, respectivamente. Não houve diferença significativa na severidade da doença nas plantas de Bonus II em pé-franco (16,5 cm<sup>2</sup>) em relação às plantas enxertadas do mesmo híbrido (14,3 cm<sup>2</sup>).

**Palavras-chave:** *Cucumis melo* var. *reticulatus*, *Didymella bryoniae*, controle alternativo, manejo integrado.



## ABSTRACT

**Effect of grafting in the control of gummy stem blight in muskmelon.** The gummy stem blight (*Didymella bryoniae*) is a very important disease for the melon crop, causing losses of 100% in production. Although the control of this disease has been basically done with the use of fungicides, alternative control measures associated, such as grafting, could be beneficial in integrated management. The objective of this study was to evaluate the effect of grafting in the control of gummy stem blight in muskmelon plants grafted on immune pumpkin to *D. bryoniae*. In greenhouse, melon plants of the hybrid Sunrise grafted on pumpkin Shelper were inoculated in the stem of the scion (crown) in the region of union with the rootstock and crown and stem of the rootstock. It was also inoculated stems of plants of melon ungrafted and stems of pumpkin. In experiments in the culture of melon in plastic greenhouse, we evaluated the development of gummy stem blight, with initial inoculum originated from seeds, the hybrids Sunrise, Bonus II, Louis and Prince Hakucho grafted on pumpkin Shelper. Under conditions of greenhouse, occurred a significant area reduction of gummy stem blight lesions in Sunrise melon plants grafted on pumpkin Shelper with inoculations on the graft (42,6 cm<sup>2</sup>) and the region of grafting (27,5 cm<sup>2</sup>), as compared to the ungrafted (64,3 cm<sup>2</sup>). In the stem of the rootstock had not symptoms of the disease. In greenhouse, there was also significant reduction in size of lesions of the disease in grafted plants, for Sunrise, Louis and Prince Hakucho, areas of lesions were 23,5; 11,6 and 11,9 cm<sup>2</sup> respectively. For ungrafted plants of these hybrids, the areas of lesions were 35,8; 21,2 and 22,5 cm<sup>2</sup>, respectively. Had not significant difference in disease severity in plants Bonus II in ungrafted (16,5 cm<sup>2</sup>) and grafted plants (14,3 cm<sup>2</sup>).

**Keywords:** *Cucumis melo* var. *reticulatus*, *Didymella bryoniae*, alternative control, integrated management.

## 1. INTRODUÇÃO

Nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, o melão nobre constitui importante cultura nas épocas quentes do ano e é cultivado em estufas plásticas tipo “túnel alto”. Essa condição de cultivo protegido proporciona a produção de frutos com qualidade superior, de excelente aspecto visual, e alto teor de sólidos solúveis (brix). Assim, os frutos obtêm excelente cotação no mercado, podendo, por isso, ser produzidos em pequenas áreas, com boa lucratividade (BRANDÃO FILHO; CALLEGARI, 1999). O cultivo em ambiente protegido também possibilita semear o melão em várias épocas, proporcionando várias colheitas por ano, além de proporcionar altos níveis de produtividade (1800-3000 frutos/1000 m<sup>2</sup> de estufa plástica) (BRANDÃO FILHO; VASCONCELLOS, 1998). Dentre os híbridos de meloeiros cultivados em ambiente protegido, destacam-se Bonus II, Sunrise, Prince Hakucho e Louis.

Em estufas plásticas, na Região Norte do Estado do Paraná, a podridão gomosa, causada por *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm é a doença mais importante, podendo causar danos totais na cultura e até inviabilizar o seu cultivo (VIDA et al., 2003; GASPAROTTO, 2006). A ocorrência de danos da ordem de 1,5 a 100% foram relatadas em culturas de melão rendilhado conduzidas em estufas plásticas no Estado do Paraná (VIDA et al., 2001).

O patógeno *D. bryoniae* pode sobreviver em restos de cultura na forma de micélio dormente (VAN STEEKELEBURG, 1983; KEINATH, 2002; 2008; SHTIENBERG et al., 2005) e também pode se manter vivo associado às sementes, podendo ocorrer transmissão para plântulas (LEE et al., 1984; SUDISHA et al., 2006; GASPAROTTO et al., 2009). Um dos grandes problemas da transmissão do patógeno via semente é a ocorrência de infecção latente em plântulas e mudas de melão (GASPAROTTO, 2006), o que dificulta a eliminação de mudas doentes antes do transplante para estufa.

Para o controle de *D. bryoniae*, diversas medidas têm sido adotadas de forma isolada ou associadas a fim de impedir que a doença se estabeleça: “mulching”, solarização, tratamento de sementes com fungicidas, uso de fungicidas em pulverizações na parte aérea da cultura e uso de cultivares resistentes ou menos suscetíveis (WIANT, 1945; KUROZAWA; PAVAN, 1997;

VAN STEEKELENBURG, 1978; VIDA et al., 2001, 2004; UTKHEDE; KOCH, 2002, 2004; KEINATH et al., 2007; SANTOS et al., 2010). No entanto, cada um desses métodos tem apresentado limitações. No caso do patógeno *D. bryoniae* em cultivos de melão, cujos principais sítios iniciais de infecção, geralmente estão localizados no caule, principalmente na região das folhas cotiledonares, o controle via pulverização da parte aérea tem apresentado pouca eficiência, devido à dificuldade em atingir o alvo biológico (KUROZAWA et al., 2005) levando, portanto, a busca por outras medidas de controle eficientes.

A enxertia em porta-enxerto imune a *D. bryoniae* pode ser uma estratégia a ser empregada, associada a outras medidas, resultando em incremento na eficiência do controle da podridão gomosa. A técnica de enxertia é utilizada, frequentemente, no processo produtivo de várias hortaliças como pepino (COSTA et al., 2001), melão rendilhado (RIZZO et al., 2004), pimentão (SANTOS; GOTO, 2004), pimentão e pimentas (OLIVEIRA et al., 2009), entre outras. Esta técnica pode oferecer uma série de vantagens em relação ao cultivo em pé-franco: aumentar a produção; incrementar a resistência a adversidades climáticas, como baixas temperaturas; aumentar a tolerância à seca e salinidade do solo; controlar desordens fisiológicas; melhorar o aspecto externo dos frutos; aumentar o vigor da planta e reduzir as doenças causadas por fungos veiculados pelo solo (SANTOS; GOTO, 2003).

Apesar das vantagens da enxertia para o controle de doenças, esta técnica tem sido pouco estudada e raros são os trabalhos desenvolvidos, principalmente para a cultura do melão e para o controle de patógenos da parte aérea. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da enxertia no controle da podridão gomosa em plantas de melão nobre 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 dos isolados de *D. bryoniae*

O isolado de *D. bryoniae* empregado foi cedido pelo Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Maringá, sendo proveniente de plantas de meloeiro nobre com sintomas de podridão gomosa. Este foi mantido em meio batata-dextrose-ágar em câmara de incubação à temperatura de 24°C e 12 horas de fotoperíodo.

#### 2.1.2. Produção das mudas

Utilizou-se o método de enxertia de fenda cheia (CAÑIZARES; GOTO, 2003), tendo como enxerto o híbrido de meloeiro nobre Sunrise e como porta-enxerto o híbrido de abóbora Shelper, por ser um dos mais utilizados na enxertia de cucurbitáceas, o mais indicado para melão rendilhado (RIZZO et al., 2004) e, principalmente, por ser imune à *D. bryoniae* (ITO et al., 2008). As mudas dos híbridos de melão nobre Sunrise e de abóbora Shelper foram produzidas em bandejas de poliestireno de 128 células, as quais foram preenchidas com substrato comercial Plant Max HF®. As sementes dos híbridos foram pré-germinadas e semeadas no referido substrato. A semeadura do porta-enxerto foi realizada quatro dias após a semeadura do meloeiro.

A enxertia foi realizada quando o porta-enxerto e a copa apresentaram a primeira folha verdadeira. As plântulas do porta-enxerto foram transplantadas para vasos plásticos contendo 300mL de substrato Plant Max HF 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 (Figura 1).



**Figura 1.** Enxertia de plantas de meloeiro nobre híbrido Sunrise em abóbora Shelper. A) Preparo do enxerto com corte em cunha; B) Encaixe do enxerto no porta-enxerto; C) Fixação do enxerto no porta-enxerto com clips; D) Plantas enxertadas em câmara úmida pós-enxertia.

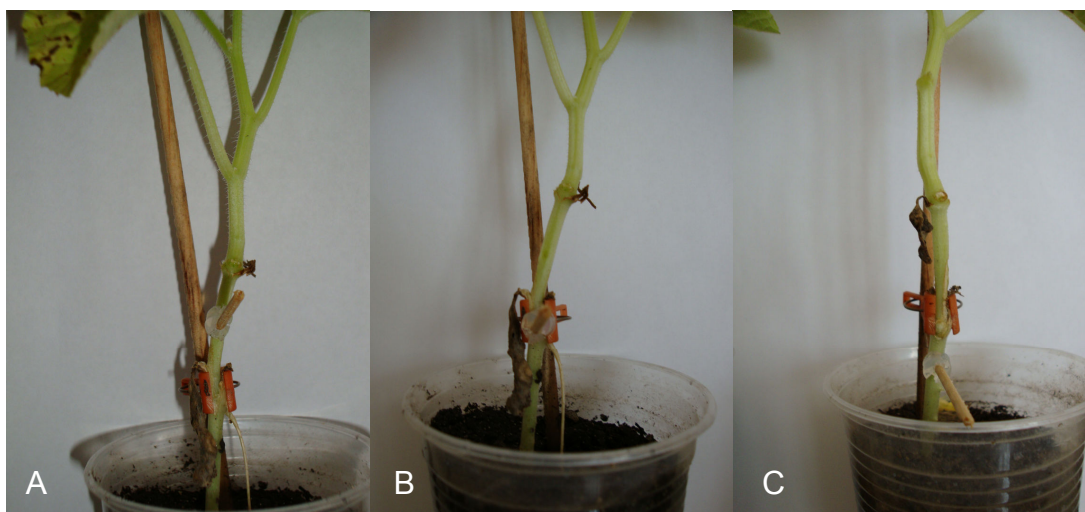
Para aumentar o índice de pegamento, o corte em forma de cunha no enxerto foi executado perpendicular as folhas cotiledonares, para que no momento da junção do enxerto e porta-enxerto as folhas cotiledonares das duas plantas ficassem em um ângulo de 90° (CAÑIZARES; GOTO, 2002).

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. Após esse período, as plantas foram transferidas para casa-de-vegetação, onde permaneceram durante todo o ensaio experimental (Figura 1D).

### 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 e meio palito de dente esterilizado, contendo o referido disco na ponta, foi inserido no caule de cada planta, seguido de 24h 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.

Realizaram-se inoculações no hipocótilo do enxerto, na região de união enxerto/porta-enxerto e no hipocótilo do porta-enxerto (Figura 2). Como

controles foram utilizadas plantas pé-franco de híbridos de melão nobre Sunrise e de abóbora Shelper, que foram inoculadas no hipocótilo.

#### **2.1.4. Delineamento experimental**

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

- Tratamento 1 - Plantas do híbrido de melão nobre Sunrise, enxertadas em abóbora Shelper e inoculadas no hipocótilo do enxerto;
- Tratamento 2 - Plantas do híbrido de melão nobre Sunrise, enxertadas em abóbora Shelper e inoculadas na região de união enxerto/porta-enxerto;
- Tratamento 3 - Plantas do híbrido de melão nobre Sunrise, enxertadas em abóbora Shelper e inoculadas no hipocótilo do porta-enxerto;
- Tratamento 4 - Plantas do híbrido de melão nobre Sunrise em pé-franco e inoculadas no hipocótilo;
- Tratamento 5 - Plantas de abóbora Shelper em pé-franco e 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 maior comprimento longitudinal e o perpendicular a ele da necrose provocada pela inoculação do patógeno. A intensidade de doença correspondeu à média das duas dimensões, 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 (teste F), e as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade (FERREIRA, 2003).

## **2.2. ENSAIO EXPERIMENTAL EM ESTUFA PLÁSTICA**

O ensaio foi desenvolvido em estufa plástica tipo túnel alto localizada no Centro Tecnológico de Irrigação, pertencente ao Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá.

### **2.2.1. Produção das mudas**

Para a instalação da cultura de meloeiro nobre em estufa plástica foram utilizados os híbridos de meloeiro nobre Bonus II, Sunrise, Prince Hakucho e Louis, enxertados em abóbora Shelper, e plantas dos mesmos híbridos em pé-franco.

As mudas enxertadas foram produzidas da mesma forma que descrito no item 2.1.2. As plantas em pé-franco foram produzidas a partir de sementes pré-germinadas dos quatro híbridos e semeadas em bandejas de poliestireno de 72 células contendo substrato comercial Plant Max HF®. A semeadura ocorreu cinco dias após a semeadura das plantas para enxertia. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação por 22 dias, até o momento do transplante para estufa.

### **2.2.2. Instalação e condução da cultura**

As plantas de melão foram transplantadas para solo em estufa plástica tipo túnel alto, coberta com polietileno de alta densidade (150 µm). O espaçamento utilizado foi de 0,3 metros entre plantas dentro da linha e de 1,0 metro entre linhas.

O pH do solo foi previamente corrigido com calcário calcítico, de acordo com análise prévia, elevando-se a saturação de bases (V%) para 80%. Como adubação de base foram utilizados 2 litros de composto orgânico (aplicado 30 dias antes do transplante), 7,2g de cloreto de potássio, 53g de superfosfato simples e 13g de uréia por metro linear de sulco de cultivo. Após 25 dias do



transplante, foi realizada uma adubação de cobertura com 13g de uréia por metro linear de sulco de cultivo.

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, sendo retirados todos os brotos laterais até o 11º entrenó. Nos entrenós 12º, 13º, e 14º as hastes secundárias foram mantidas, onde surgiram as flores/frutos. Nestas hastes foram retirados todos os brotos que surgiram e a poda foi efetuada a uma folha após o fruto. Nos próximos entrenós do caule continuou-se a retirar todos os brotos até o vigésimo. Nos entrenós 21º, 22º, 23º a haste secundária foi mantida e realizou-se a poda apical da planta. Nestas hastes secundárias, deixou-se crescer uma nova brotação (hastes terciárias), uma folha após o surgimento desta haste terciária realizou-se a poda. Estas três hastes terciárias tiveram crescimento livre. Quando do início do desenvolvimento dos frutos, foram deixadas apenas duas hastes secundárias, com um fruto por haste.

Após a instalação da cultura foram realizadas capinas manuais, quando necessária aplicação dos inseticidas tiametoxam (0,5g i.a./L), imidaclopride (1,2g i.a./L) e dissulfan (1,1g 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 epoxiconazol + piraclostrobina (0,1+0,3g i.a./L) foram iniciadas sete dias após o transplante da mudas e foram realizadas a cada dez dias. Utilizou-se irrigação localizada com o uso de tubo de gotejo em um turno conforme a necessidade da cultura.

### **2.2.3. Delineamento Experimental**

As mudas no cultivo em estufa plástica foram arranjadas no delineamento experimental de blocos ao acaso constituído por oito tratamentos, seis repetições e parcela útil representada por seis plantas por parcela. Os tratamentos utilizados para avaliação da técnica de enxertia no controle da podridão gomosa foram:

- Tratamento 1 - Planta do híbrido Sunrise em pé-franco;
- Tratamento 2 - Planta do híbrido Sunrise enxertada em abóbora Shelper;
- Tratamento 3 - Planta do híbrido Bonus II em pé-franco;
- Tratamento 4 - Planta do híbrido Bonus II enxertada em abóbora Shelper;
- Tratamento 5 - Planta do híbrido Louis em pé-franco;
- Tratamento 6 - Planta do híbrido Louis enxertada em abóbora Shelper;
- Tratamento 7 - Planta do híbrido Prince Hakucho em pé-franco;
- Tratamento 8 - Planta do híbrido Prince Hakucho enxertada em abóbora Shelper.

Neste experimento não foi realizada inoculação artificial de *D. bryoniae*. O inóculo foi originário naturalmente das sementes e/ou do local de plantio. A estufa onde se realizou o experimento havia sido cultivada anteriormente com as culturas melão e pepino, com histórico de epidemia de podridão gomosa.

#### **2.2.4. Avaliações e análise dos resultados**

As avaliações foram realizadas diariamente até o aparecimento dos primeiros sintomas e, a partir de então, foram efetuadas a cada dez dias. Foi avaliada a incidência de podridão gomosa, representada pela porcentagem de plantas com sintomatologia da doença no caule em cada avaliação.

A doença foi quantificada medindo-se o maior comprimento longitudinal e o perpendicular a ele à medida que as lesões foram aparecendo no caule das plantas. A severidade da doença em cada planta foi o produto das duas dimensões dividido por dois, constituindo a área média da lesão em centímetros quadrados.

Os dados de incidência e severidade da podridão gomosa foram utilizados no estabelecimento de 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. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (teste F), e as médias, agrupadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade (FERREIRA, 2003).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. ENSAIO EXPERIMENTAL EM CASA-DE-VEGETAÇÃO

No ensaio experimental em casa-de-vegetação, o nível de compatibilidade inicial (pegamento da enxertia) foi de 99%. Este valor foi equivalente ao obtido por Ito et al. (2008), utilizando o híbrido Bonus II e o porta-enxerto Shelper.

Após 28 dias da inoculação, a maior severidade de podridão gomosa foi observada nas plantas pé-franco de meloeiro, com área de lesão de 64,3 cm<sup>2</sup>, sendo significativamente diferente, ao nível de 5% de probabilidade, dos outros tratamentos (Quadro 1). Para as plantas enxertadas inoculadas no hipocótilo do enxerto e as inoculadas na região de união enxerto/porta-enxerto, as lesões atingiram área de 42,6 e 27,5 cm<sup>2</sup>, respectivamente (Quadro 1).

**Quadro 1.** Severidade de podridão gomosa em plantas de meloeiro nobre Sunrise enxertadas em abóbora Shelper e em pé-franco e inoculadas em diferentes pontos.

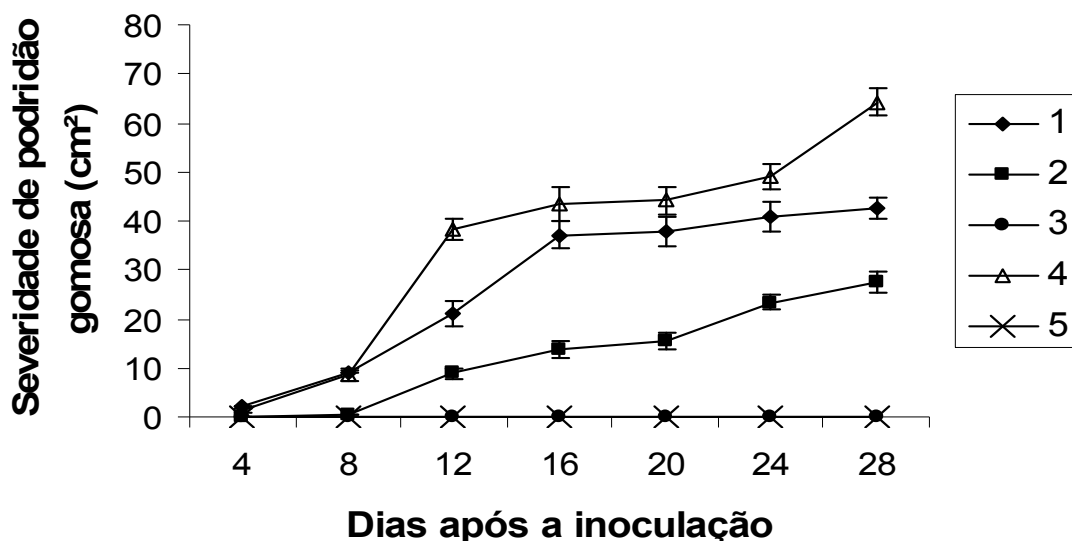
Ponto da inoculação <sup>1</sup>	Severidade (cm <sup>2</sup> ) <sup>2</sup>	Redução da área da lesão (%) <sup>3</sup>
1	42,6 b	33,8
2	27,5 b	57,3
3	0 c	100,0
4	64,3 a	0,0
5	0 c	100,0
<b>CV</b>	<b>29,57%</b>	

<sup>1</sup>1- Plantas do híbrido Sunrise enxertadas em abóbora Shelper, inoculadas no hipocótilo do enxerto; 2- Plantas do híbrido Sunrise, enxertadas em abóbora Shelper, inoculadas na região de união enxerto/porta-enxerto; 3- Plantas do híbrido Sunrise, enxertadas em abóbora Shelper inoculadas no hipocótilo do porta-enxerto; 4- Plantas do híbrido Sunrise, em pé-franco, inoculadas no hipocótilo; 5- Plantas de abóbora Shelper, em pé-franco, inoculadas no hipocótilo.

<sup>2</sup>Média de seis repetições. Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, pertencem ao mesmo agrupamento, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

<sup>3</sup>Redução da área da lesão obtida por regra de três inversa, considerando o tratamento com maior área de lesão como 100%.

Inicialmente, as plantas do híbrido Sunrise em pé-franco e as enxertadas inoculadas no hipocótilo do enxerto apresentaram severidade semelhante de podridão gomosa (Figura 3). A partir do oitavo dia da inoculação, as plantas não enxertadas apresentaram maior taxa de desenvolvimento da doença. Esta condição permaneceu até o final das avaliações.



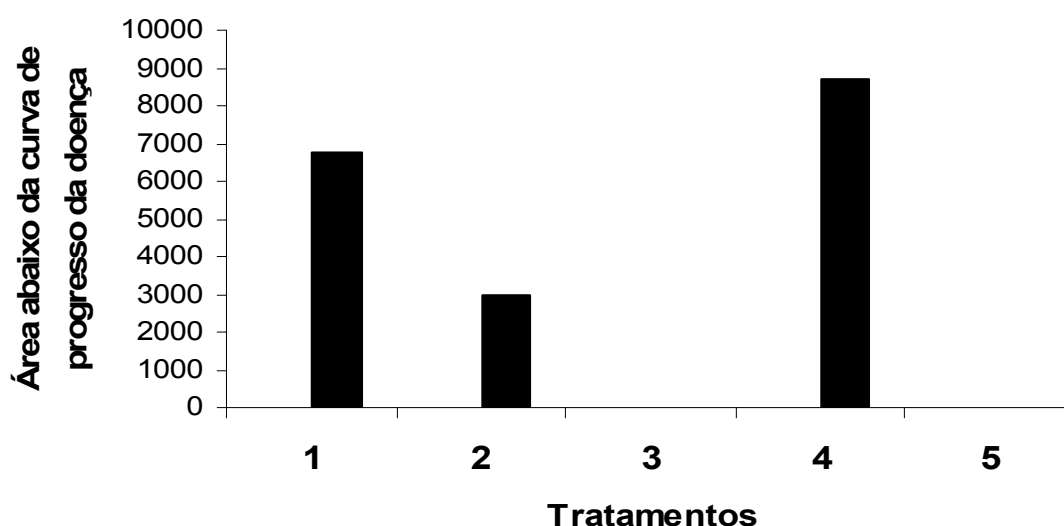
**Figura 3.** Curvas de progresso da podridão gomosa em plantas de meloeiro nobre enxertadas e em pé-franco, inoculadas em diferentes pontos: 1- Plantas do híbrido Sunrise, enxertadas em abóbora Shelper, inoculadas no hipocótilo do enxerto; 2- Plantas do híbrido Sunrise, enxertadas em abóbora Shelper, inoculadas na região de união enxerto/porta-enxerto; 3- Plantas do híbrido Sunrise, enxertadas em abóbora Shelper, inoculadas no hipocótilo do porta-enxerto; 4- Plantas do híbrido Sunrise, em pé-franco, inoculadas no hipocótilo; 5- Plantas de abóbora Shelper, em pé-franco, inoculadas no hipocótilo.

Nas plantas enxertadas e inoculadas no ponto da enxertia só ocorreu sintomas de podridão gomosa após o oitavo dia da inoculação, mostrando que quando inoculado próximo ao porta-enxerto imune, o patógeno demorou mais para causar sintomas nas plantas inoculadas. No tratamento em questão, o progresso da doença ocorreu de forma mais lenta e com menor intensidade que nos tratamentos 1 e 4.

As plantas pé-franco de abóbora inoculadas como testemunha não apresentaram sintomas da doença ou sinais do patógeno, como já se esperava, por esta ser imune à *D. bryoniae*. O mesmo ocorreu com as plantas

enxertadas que foram inoculadas abaixo do ponto da enxertia (porta-enxerto), demonstrando que a técnica de enxertia não afeta a resistência do porta-enxerto abóbora Shelper ao patógeno *D. bryoniae*. Ito et al. (2008) demonstraram que os porta-enxertos para melão Ikky, Agroceres, Kirameki e Shelper foram resistentes à *D. bryoniae* e as progênies de melancia 1a, 2a, 5a, 1b, 2b, 5b, foram suscetíveis ao patógeno.

Houve efeito da enxertia em cavalo imune na redução da AACPD da podridão gomosa em plantas de meloeiro nobre (Figura 4). As plantas pé-franco de melão apresentaram maior valor de AACPD, seguida pelas plantas enxertadas inoculadas no enxerto e as inoculadas na região da enxertia.



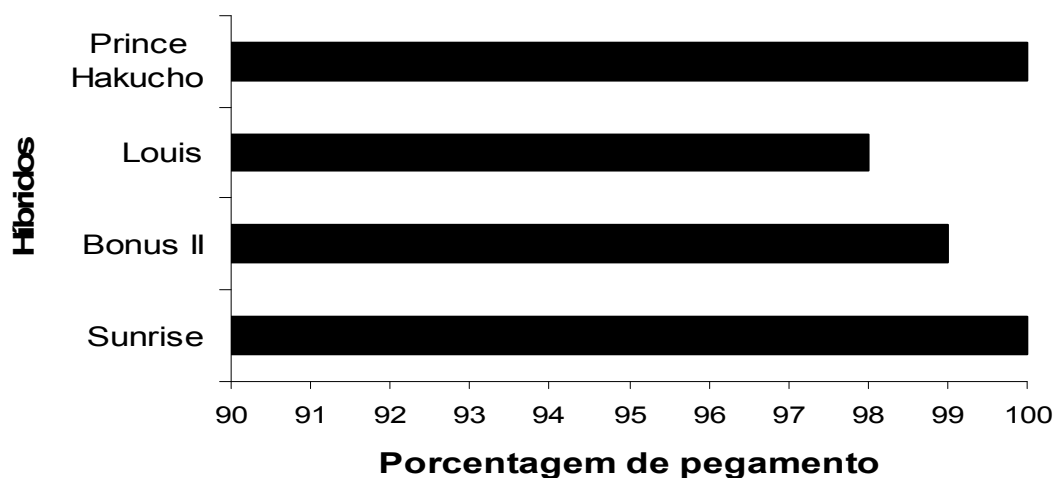
**Figura 4.** Área abaixo da curva de progresso da podridão gomosa (AACPD) em plantas de meloeiro nobre pé-franco e enxertadas de acordo com o local da inoculação: 1- Plantas do híbrido Sunrise, enxertadas em abóbora Shelper, inoculadas no hipocótilo do enxerto; 2- Plantas do híbrido Sunrise, enxertadas em abóbora Shelper, inoculadas na região de união enxerto/porta-enxerto; 3- Plantas do híbrido Sunrise, enxertadas em abóbora Shelper, inoculadas no hipocótilo do porta-enxerto; 4- Plantas do híbrido Sunrise, em pé-franco, inoculadas no hipocótilo; 5- Plantas de abóbora Shelper, em pé-franco, inoculadas no hipocótilo.

Resultados semelhantes foram obtidos por Aguiar (2008), que avaliando seis híbridos de pepino “japonês” (Hokushin, Taisho, Samurai, Tsuyataro, Natsubayashi e Soundai), enxertados em abóbora Shelper, obteve

menores valores de severidade de podridão gomosa que nas plantas em pé-franco.

### 3.2. ENSAIO EXPERIMENTAL EM ESTUFA PLÁSTICA

Para o ensaio em estufa plástica, o índice de compatibilidade da enxertia aos 20 dias foi de 100% para os híbridos Sunrise e Prince Hakucho, 99% para o híbrido Bonus II e 98% para o híbrido Louis (Figura 5). Estes elevados índices de pegamento são decorrentes da compatibilidade dos enxertos com o porta-enxerto, da equivalência do diâmetro dos hipocótilos obtida com a semeadura em épocas diferenciadas e pelo posicionamento do enxerto sobre o porta-enxerto formando um ângulo de 90°. Estes fatores são apresentados por Goto et al. (2003) como importantíssimo para o sucesso da enxertia em cucurbitáceas, assim como manter as plantas em local com temperatura em torno de 28°C e umidade relativa elevada após a enxertia.



**Figura 5.** Porcentagem de pegamento, após 20 dias da realização da enxertia dos híbridos de meloeiro nobre Sunrise, Bonus II, Louis e Prince Hakucho sob abóbora Shelper.

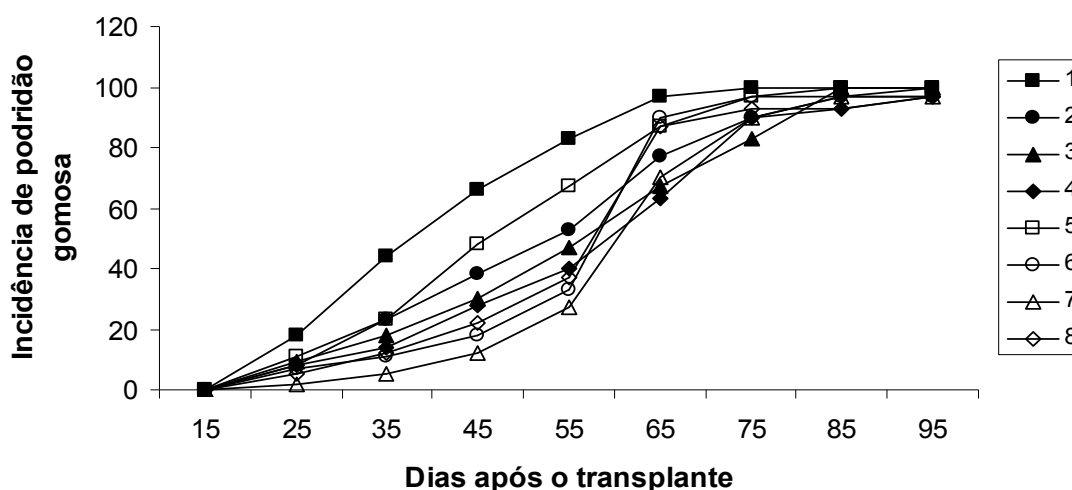
Índices de pegamento inferiores a 80% foram obtidos quando da enxertia do híbrido Bonus II nos porta-enxertos Abobrinha-Italiana-Caseta Melhorada, Pepino-Caipira Rubi, Abóbora-Squash e Abóbora-Nova-Caravela (ITO et al., 2009). Os autores argumentam que este índice pode ter ocorrido devido ao estresse causado nas plantas pela alta temperatura no dia da

enxertia; pelos porta-enxertos apresentarem características diferentes do enxerto, como velocidade de crescimento e fisiologia; pelo semeio tanto do enxerto como dos porta-enxertos no mesmo dia, o que acarretou em maior diâmetro do hipocótilo das abóboras em relação ao enxerto Bonus II. Assim, antes de se realizar o processo de enxertia é muito importante a observação da compatibilidade, fisiologia e velocidade de desenvolvimento das plantas a serem enxertadas.

Os primeiros sintomas de podridão gomosa foram observados 25 dias após o transplante das mudas para a estufa plástica em todos os tratamentos (enxertados e não enxertados). O início dos sintomas correspondeu com a senescência das folhas cotiledonares, em todos os tratamentos. Os sintomas iniciaram-se no caule, na região de inserção das folhas cotiledonares senescentes, como lesões inicialmente aquosas e que, posteriormente, tornaram-se necróticas, com coloração palha clara. As lesões cresciam longitudinalmente e transversalmente e, em muitas plântulas, ocorria o fendilhamento do caule.

Nas plantas enxertadas, os sintomas se desenvolveram apenas no enxerto, começando próximo as folhas cotiledonares e evoluindo ascendentemente, não apresentando sintomas no porta-enxerto. Foi constatada, nas lesões, tanto de plantas enxertadas quanto em pé-franco a ocorrência de exsudação de goma e, nos tecidos com sintomas mais velhos, ocorreu à formação de numerosos corpos de frutificação negros. Sintomas semelhantes em plantas de cucurbitáceas em pé-franco foram observados nos trabalhos desenvolvidos por Wiant (1945), Chiu e Walker (1949) e Gasparotto et al. (2009).

Aos 25 dias do transplante, a incidência de podridão gomosa foi de 11, 7, 2 e 5% para os híbridos Sunrise, Bonus II, Louis e Prince Hakucho, enxertados em abóbora Shelper, e 18, 8, 9 e 8% nas plantas dos mesmos híbridos em pé-franco, respectivamente. Aos 95 dias, a incidência de podridão gomosa foi de 100, 97, 97 e 97% para os híbridos Sunrise, Bonus II, Louis e Prince Hakucho enxertados e de 100% para todos os tratamentos em pé-franco (Figura 6). A enxertia em cavalo imune não evitou a transmissão do patógeno das sementes para as plantas dos quatro híbridos.



**Figura 6.** Incidência de podridão gomosa em plantas de meloeiro nobre em pé-franco e enxertadas: 1- Híbrido Sunrise pé-franco; 2- Híbrido Bonus II pé-franco; 3- Híbrido Louis pé-franco; 4- Híbrido Prince Hakucho pé-franco; 5- Híbrido Sunrise enxertado em abóbora Shelper; 6- Híbrido Bonus II enxertado em abóbora Shelper; 7- Híbrido Louis enxertado em abóbora Shelper; 8- Híbrido Prince Hakucho enxertado em abóbora Shelper.

Aos 95 dias após o transplante para a estufa, o híbrido Sunrise em pé-franco foi o que apresentou maior severidade de podridão gomosa com severidade de 35,8 cm<sup>2</sup>, diferenciando-se significativamente dos demais híbridos testados (Quadro 2). Quando o híbrido foi enxertado em abóbora imune, a severidade continuou elevada (23,5 cm<sup>2</sup>), diferenciando-se dos demais híbridos enxertados. Porém, ocorreu redução de 34,3% da área lesionada pelo patógeno das plantas em pé-franco para as enxertadas.

**Quadro 2.** Severidade de podridão gomosa e redução da área das lesões em plantas de meloeiro nobre em pé-franco e enxertadas.

Híbrido de meloeiro	Severidade (cm <sup>2</sup> ) <sup>1</sup>		Redução da área da lesão (%) <sup>2</sup>
	Pé-franco	Enxertado	
Sunrise	35,8 A a	23,5 A b	34,3
Bonus II	16,5 B a	14,3 B a	13,3
Louis	21,2 B a	11,6 B b	45,3
Prince Hakucho	22,5 B a	11,9 B b	47,2
CV %	30,17		

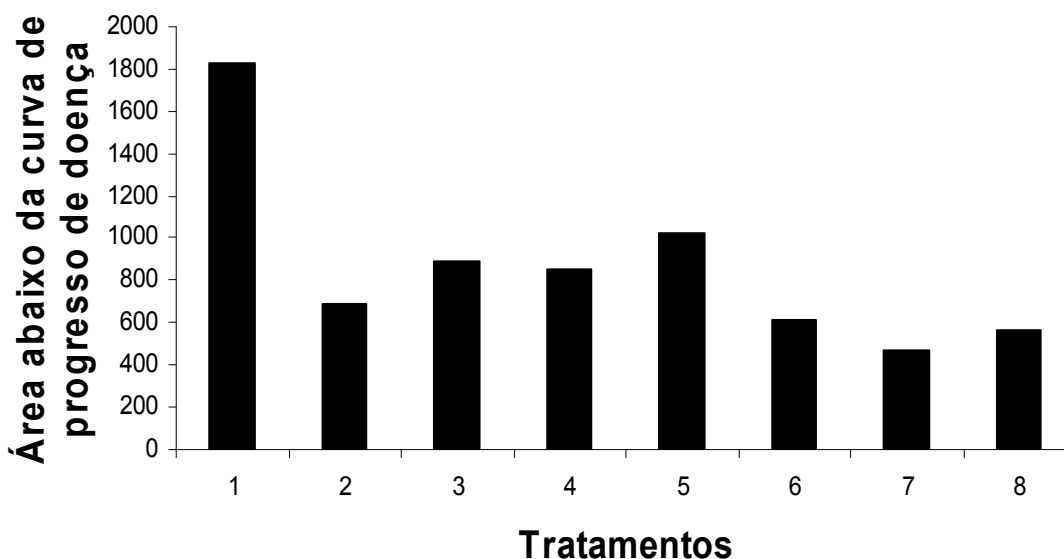
<sup>1</sup>Média de seis repetições. Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, pertencem ao mesmo agrupamento, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

<sup>2</sup>Redução da área da lesão obtida por regra de três inversa, considerando a área de lesão das plantas em pé-franco como 100%, para cada híbrido.



Os híbridos Bonus II, Louis e Prince Hakucho, tanto em pé-franco quanto enxertados, não diferiram entre si quanto à severidade de podridão gomosa e apresentaram área média de lesão de 16,5; 21,2 e 22,5 cm<sup>2</sup> para plantas em pé-franco e 14,3; 11,6 e 11,9 cm<sup>2</sup> para plantas enxertadas, respectivamente.

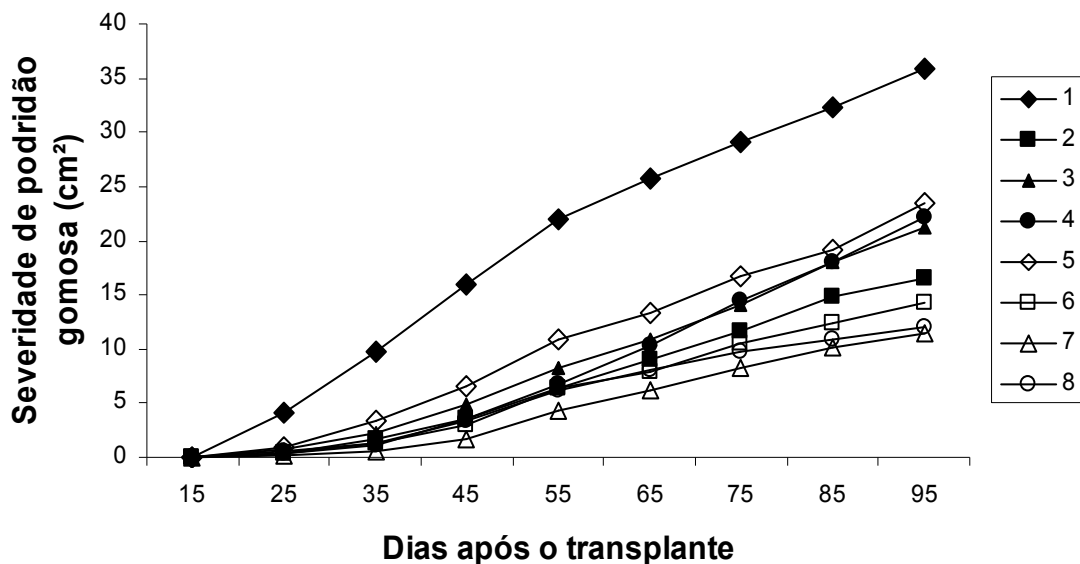
As plantas dos híbridos Sunrise, Louis e Prince Hakucho, enxertadas em abóbora Shelper, apresentaram ao final do ciclo de cultivo menor intensidade de podridão gomosa quando comparadas as plantas dos mesmos híbridos não enxertadas (Quadro 2 e Figura 7). Já, as plantas do híbrido Bonus II não apresentaram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre a severidade da doença em plantas enxertadas e não enxertadas (Quadro 2 e Figura 7). Os híbridos Prince Hakucho e Louis apresentaram redução de 47,2 e 45,3%, respectivamente, da área lesionada pelo patógeno nas plantas enxertadas em comparação com as plantas em pé-franco dos mesmos híbridos. A menor redução ocorreu nas plantas enxertadas do híbrido Bonus II (13,3%).



**Figura 7.** Área abaixo da curva de progresso da doença podridão gomosa (AACPD) em plantas de meloeiro nobre pé-franco e enxertadas: 1- Híbrido Sunrise, pé-franco; 2- Híbrido Bonus II, pé-franco; 3-Híbrido Louis, pé-franco; 4- Híbrido Prince Hakucho, pé-franco; 5- Híbrido Sunrise, enxertado; 6- Híbrido Bonus II, enxertado; 7- Híbrido Louis, enxertado; 8- Híbrido Prince Hakucho, enxertado.

Pelas curvas de progresso da doença são apresentados as diferenças das dinâmicas de progresso da podridão gomosa em plantas pé-franco e enxertadas dos híbridos avaliados (Figura 8). Destaca-se o híbrido Sunrise, em pé-franco, que desde a primeira avaliação, se diferenciou dos outros tratamentos, mostrando-se mais suscetível. Observando-se a Figura 6 nota-se, também, que a incidência inicial (15 dias após o transplante) da doença foi maior no híbrido Sunrise, tanto em pé-franco quanto enxertado, em comparação com os demais híbridos avaliados.

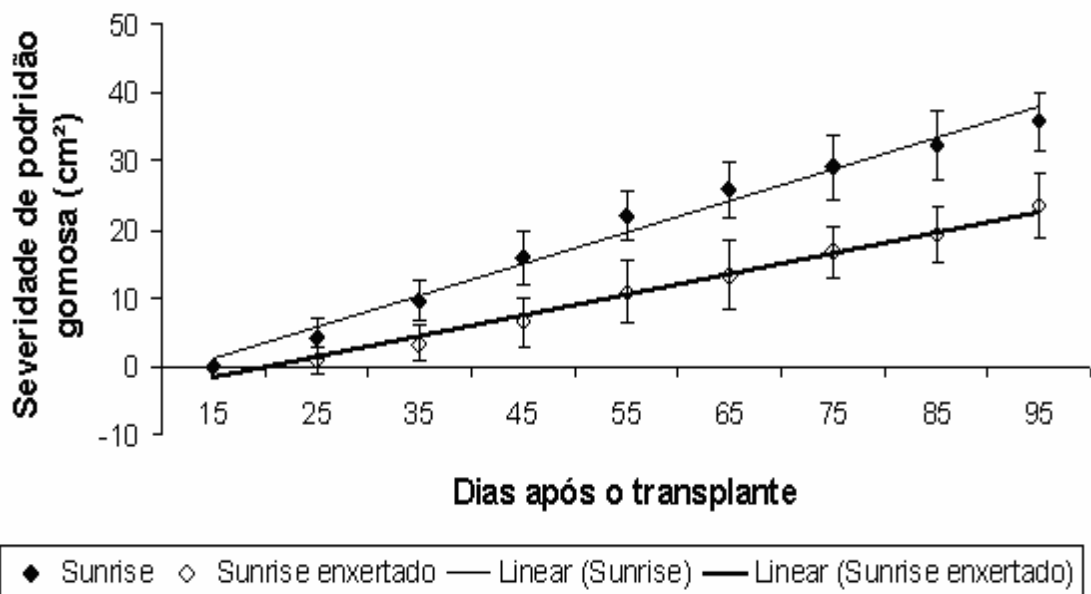
As diferenças entre os híbridos quanto ao efeito da enxertia na redução da podridão gomosa, estão relacionadas, possivelmente, com a diferença de suscetibilidade dos quatro híbridos ao agente etiológico da doença. Maior severidade e incidência de podridão gomosa foram relatadas no híbrido Sunrise em comparação com os híbridos Bonus II e Prince Hakucho (GASPAROTTO, 2006). Plântulas do híbrido Bonus II apresentaram valores intermediários e plântulas do híbrido Prince Hakucho menores severidade e incidência, demonstrando diferenças de suscetibilidade ao patógeno.



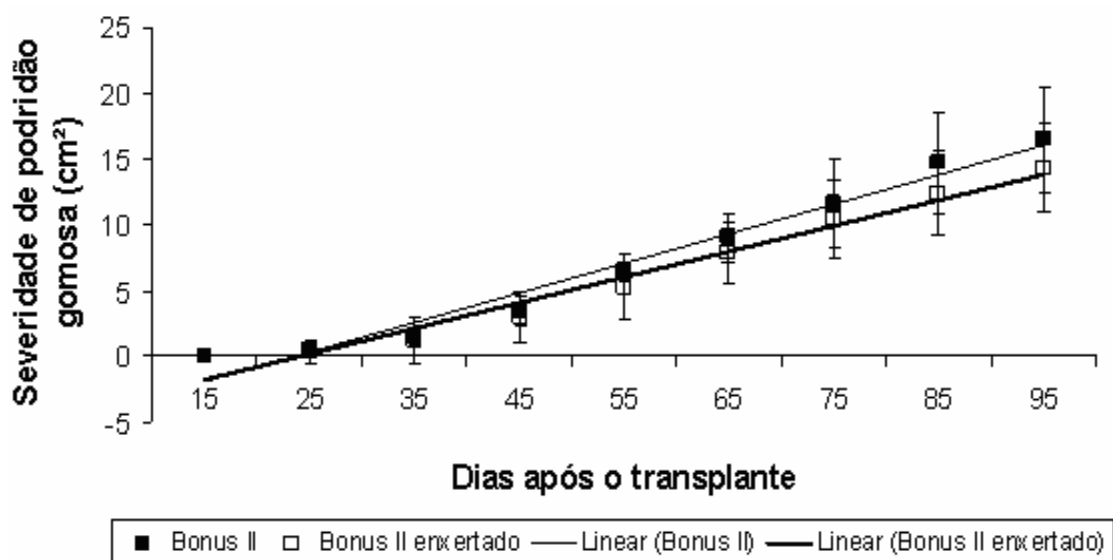
**Figura 8.** Curvas de progresso da podridão gomosa em plantas de meloeiro nobre em pé-franco e enxertadas: 1- Híbrido Sunrise, pé-franco; 2- Híbrido Bonus II, pé-franco; 3- Híbrido Louis, pé-franco; 4- Híbrido Prince Hakucho, pé-franco; 5- Híbrido Sunrise, enxertado; 6- Híbrido Bonus II, enxertado; 7- Híbrido Louis, enxertado; 8- Híbrido Prince Hakucho, enxertado.

A severidade, expressa pela área de lesões no caule, aumentou de maneira aproximadamente linear com o tempo, para todos os híbridos avaliados, tanto enxertados quanto em pé-franco (Figuras 9, 10, 11 e 12). Não houve diferença no padrão de desenvolvimento da doença em plantas enxertadas e em pé-franco para os quatro híbridos avaliados. Porém, nas plantas enxertadas dos híbridos Sunrise, Louis e Prince Hakucho a taxa de progresso da doença foi significativamente menor, resultando em menor intensidade da doença no final do ciclo da cultura.

Resultados semelhantes de progresso linear de podridão gomosa em cucurbitáceas foram obtidos em dois ensaios experimentais, onde as curvas de progresso de podridão gomosa na cultura de melancia foram bimodais, sendo, até 74 dias após o plantio (DAP), aproximadamente lineares e, a partir de 75 DAP, apresentaram forma exponencial, devido os danos provocados pela colheita dos frutos (SANTOS, 2005).

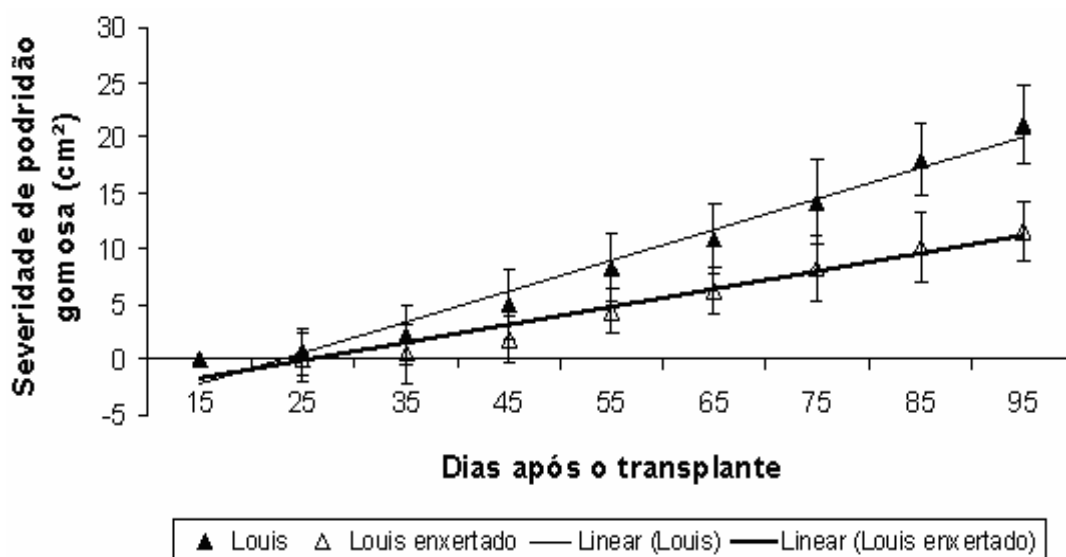


**Figura 9.** Curva de progresso de podridão gomosa em plantas de meloeiro nobre Híbrido Sunrise em pé-franco e enxertadas.

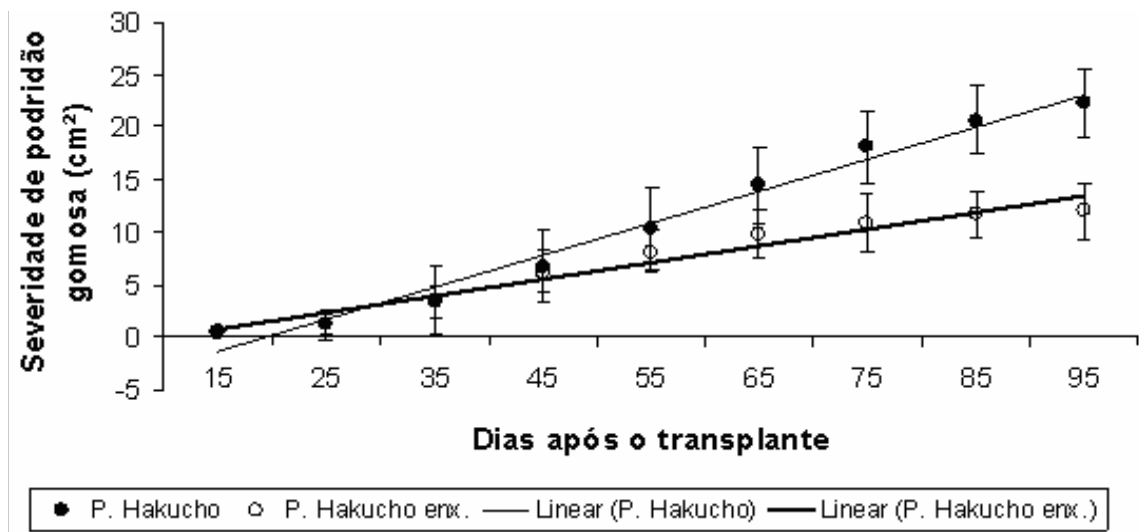


**Figura 10.** Curva de progresso de podridão gomosa em plantas de meloeiro nobre Híbrido Bonus II em pé-franco e enxertadas.

A intensidade da doença no tempo é função do nível de inóculo ou doença inicial, da taxa de progresso e do tempo de exposição da cultura no campo. Observando as figuras 9, 10, 11 e 12 nota-se que a técnica de enxertia reduz a taxa de progresso da podridão gomosa nas plantas enxertadas em relação as não enxertadas, acarretando em menor intensidade da doença nas plantas enxertadas dos quatro híbridos aos 95 dias do transplante.



**Figura 11.** Curva de progresso de podridão gomosa em plantas de meloeiro nobre Híbrido Louis em pé-franco e enxertadas.



**Figura 12.** Curva de progresso de podridão gomosa em plantas de meloeiro nobre Híbrido Prince Hakucho em pé-franco e enxertadas.

A técnica de enxertia em cavalo imune é utilizada em hortaliças, na maioria dos casos, para evitar doenças ocasionadas por patógenos radiculares, não ocorrendo infecção nas plantas enxertadas. No caso da enxertia de meloeiro nobre em cavalo imune, ocorre a infecção por *D. bryoniae*, mas há redução na taxa de progresso da doença. Para reduzir ainda mais a intensidade da doença no campo podem ser utilizadas, juntamente com a técnica de enxertia, outras medidas de controle que proporcionem redução do inóculo inicial, a taxa de progresso e ou o tempo de exposição ao patógeno, como tratamento de sementes, uso de mulching, pulverizações com fungicidas ou produtos alternativos, rotação de culturas, eliminação dos restos culturais, entre outras.

Diante dos resultados, a técnica de enxertia com porta-enxerto imune mostrou efeito redutor significativo sobre a podridão gomosa nos híbridos de meloeiro nobre Sunrise, Louis e Prince Hakucho, cultivados sob estufa plástica. Esse resultado potencializa o uso dessa técnica como uma medida que pode ser utilizada em associação com outras no manejo da podridão gomosa em culturas de meloeiro nobre.

#### 4. CONCLUSÕES

- A enxertia em porta-enxerto imune proporcionou redução da severidade de *D. bryoniae* em plantas de meloeiro nobre em casa-de-vegetação.
- Em cultivo sob estufa plástica a enxertia empregando porta-enxerto imune teve efeito significativo na redução da severidade de *D. bryoniae* nos híbridos de meloeiro nobre Sunrise, Louis e Prince Hakucho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, B. M. **Caracterização molecular, cultural e patogênica de *Didymella bryoniae* de cucurbitáceas.** Maringá: UEM, 62p (Tese Doutorado), 2008.
- BRANDÃO FILHO, J. U. T.; CALLEGARI, O. Cultivo de hortaliças em solo em ambiente protegido. **Informe agropecuário**, v. 20, p. 64-68, 1999.
- BRANDÃO FILHO, J. U. T, VASCONCELLOS, M. A. S. A cultura do meloeiro. In: GOTO, R., TIVELLI, S. W. **Produção de hortaliças em ambiente protegido: condições subtropicais.** São Paulo: Fundação Editora da UNESP, 1998, p.161-194.
- CAÑIZARES, K. A. L.; GOTO, R. Comparação de métodos de enxertia em pepino. **Horticultura Brasileira**, v.20, n.1, p.95-99, 2002.
- 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, 2003. p.55-56.
- CHIU, W. F.; WALKER, J. C. Morphology and variability of the cucurbit black rot fungus. **Journal of Agricultural Research**, v. 78, p. 81-102, 1949.
- 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**, 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.
- GASPAROTTO F. **Avaliação da sanidade de sementes de híbridos de meloeiro nobre indicados para cultivo protegido.** Maringá: UEM, 42p (Tese Mestrado), 2006.
- GASPAROTTO, F; VIDA, J. B.; TESSMANN, D. J.; BONALDO, S. M.; AGUIAR, R. L.; PENHARBEL, M. P. Eficiência de métodos para detecção de *Didymella bryoniae* associado a sementes de híbridos de meloeiros nobres. **Acta Scientiarum-Agronomy**, v.31, p.397-402, 2009.
- GOTO, R.; CAÑIZARES, K. A. L.; STRIPARI, P. C. Fatores que influenciam a enxertia. 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.25-33.

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.; CHARLO, H. C. O.; CASTOLDI, R.; BRAZ, L. T.; CAMARGO, M. Seleção de porta-enxertos resistentes ao cancro da haste e seus efeitos na produtividade de melão 'Bonus nº 2'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 1, p. 262-267, 2009.

KEINATH, A. P. Survival of *Didymella bryoniae* in buried watermelon vines in South Carolina. **Plant Disease**, v. 86, p. 32-38, 2002.

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. Survival of *Didymella bryoniae* in infested muskmelon crowns in South Carolina. **Plant Disease**, v. 92, p. 1223-1228, 2008.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças das cucurbitáceas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (eds.) **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3ed., v.2, São Paulo: Agronômica Ceres. 1997. p. 325-337.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A.; REZENDE, J. A. M. Doenças das cucurbitáceas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**, 2, 4ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p.293-302, 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.

OLIVEIRA, C. D.; BRAZ, L. T.; SANTOS, J. M.; BANZATTO, D. A.; OLIVEIRA, P. R. Resistência de pimentas a nematóides de galha e compatibilidade enxerto/porta-enxerto entre híbridos de pimentão e pimentas. **Horticultura Brasileira**, v.27, p.520-526, 2009.

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 fitófтора em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.1, p. 45-49, 2004.

SANTOS, G. R. **Biologia, epidemiologia e manejo do cretamento gomoso do caule da melancia, causado por *Didymella bryoniae***. Brasília: UNB, 232p. (Tese doutorado), 2005.

SANTOS, G. R.; CASTRO NETO, M. D.; CARVALHO, A. R. S.; FIDELIS, R. R.; AFFÉRI, F. S. Fontes e doses de silício na severidade do cretamento gomoso e produtividade da melancia. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 266-272, 2010.

SHTIENBERG, D., GAMLIEL-ATINSKY, E., RETIG, B., BRENER, S., AND 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, p. 196-205, 2006.

UTKHEDE, R.S.; KOCH, C.A. Chemical and biological treatments for control of gummy stem blight of greenhouse cucumbers. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, p. 443–448, 2002.

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.

VAN STEEKELEMBURG, N.A.M. Chemical control of *Didymella bryoniae* in cucumbers. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.84, p.27-34, 1978.

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.

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.; ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. Manejo de doenças em cultivos protegidos. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.) **Manejo integrado - fitossanidade - cultivo protegido, pivô central e plantio direto**. Viçosa: UFV. 2001, p.53-118.

VIDA, J. B.; VERZIGNASSI, J. R.; TESSMANN, D. J.; OLIVEIRA, R. R.; CAIXETA, M. P.; NUNES, W. M. C. Manejo de doenças na produção de cucurbitáceas em cultivo protegido. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.177-195, 2003.

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.

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