

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

PAULO FRANCISCO MARAUS

Detecção, infecção latente e quantificação de *Didymella bryoniae* em
melancia

MARINGÁ - PARANÁ - BRASIL

FEVEREIRO DE 2017

PAULO FRANCISCO MARAUS

Detecção, infecção latente e quantificação de *Didymella bryoniae* em
melancia

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Agronomia.

Área de concentração: Proteção de plantas

Orientador: Prof. Dr. João Batista Vida

MARINGÁ - PARANÁ - BRASIL

FEVEREIRO DE 2017

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

M311d Maraus, Paulo Francisco
Detecção, infecção latente, infecção sistêmica e
escala de avaliação do Crestamento-gomoso-do-caule
(*Didymella bryoniae*) em melancia e melão / Paulo
Francisco Maraus. -- Maringá, 2017.
89 f. : figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Vida.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento
de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, 2017.

1. Melancia (*Citrullus lanatus*). 2. Crestamento-
gomoso-do-caule (*Didymella bryoniae*) - Melancia e
melão. 3. Melancia (*Citrullus lanatus*) - Patologia
de sementes. 4. Detecção molecular. 5. Escala de
notas - Crestamento-gomoso-do-caule. 6. Melão
(*Cucumis melo* L.) I. Vida, João Batista, 1954-,
orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro
de Ciências Agrárias. Departamento de Agronomia.
Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDD 23.ed. 635.615

Gláucia Volponi de Souza - CRB-9/948

FOLHA DE APROVAÇÃO

PAULO FRANCISCO MARAUS

Detecção, infecção latente e quantificação de *Didymella bryoniae* em
melancia

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Agronomia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. João Batista Vida

Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^a. Dr^a Edilaine Maurícia Gelinski Grabicoski

Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Dauri José Tessmann

Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a Maria Isabel Balbi Penã

Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes

Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 21 de fevereiro de 2017.

Local de defesa: Sala 16, Bloco J-45, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade, pelo Dom da piedade, resiliência e consciência.

À minha família, pelo exemplo, apoio e paciência.

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

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá (PGA/UEM), pelo suporte e oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudo durante parte da realização deste doutorado.

Ao Prof. Dr. Willian Mário de Carvalho Nunes e ao Técnico Carlos Alexandre Zanutto pela disponibilização do laboratório de análises moleculares e suporte na realização dos trabalhos.

À Mariana pelo apoio, paciência e suporte incondicional ao longo de todos esses anos.

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

RESUMO

MARAUS, Paulo Francisco. **Detecção, infecção latente e quantificação de *Didymella bryoniae* em melancia.** Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2017. Orientador: Prof. Dr. João Batista Vida.

O fungo *Didymella bryoniae* é um importante patógeno na cultura da melancia (*Citrullus lanatus*) e outras cucurbitáceas, causando a doença conhecida como crestamento-gomoso-do-caule, além de outros sintomas como tombamento de plântulas, manchas foliares e podridão em frutos. *D. bryoniae* é transmitido via sementes infectadas, servindo como uma das formas potencialmente mais perigosas e silenciosas de dispersão global do patógeno e introdução em novas áreas. Há também indícios de ocorrência de infecção latente e infecção sistêmica na cultura da melancia, mecanismo já comprovado para outras cucurbitáceas. O crestamento-gomoso-do-caule é uma das principais doenças da cultura da melancia causando danos ao longo de todo o ciclo. Em condições de cultivo protegido o crestamento-gomoso-do-caule pode se tornar um grande problema devido à perpetuação do inóculo e modificações na expressão da doença em relação às condições de campo, com maior proporção de sintomas em caules em detrimento das folhas. Apesar da grande importância mundial desse patossistema, ainda há carência de estudos relacionados à cultura da melancia e ao cultivo de cucurbitáceas em ambiente protegido. Em função destas características, é importante a investigação da eficiência de métodos de detecção do patógeno em sementes, afim de garantir a qualidade de lotes de sementes e a criação de ferramentas de avaliação do crestamento-gomoso-do-caule para estas condições. Desta forma, este trabalho teve o objetivo de estudar a detecção, transmissão de *D. bryoniae* em plantas de melancia, avaliar a ocorrência de infecção latente e infecção sistêmica; e a criação de uma escala de avaliação do crestamento-gomoso-do-caule nas culturas da melancia e melão. O trabalho foi dividido em três capítulos: O Capítulo I teve o objetivo de comparar a eficiência de diferentes métodos de detecção *D. bryoniae* em sementes de seis cultivares de melancia. As sementes foram submetidas previamente a detecção molecular de *D. bryoniae* através de PCR multiplex. Na sequência foram comparados oito métodos de detecção do patógeno, compostos pelos testes de transmissão em substrato comercial e areia+solo; testes de transmissão em meio ágar-água e vermiculita expandida; e testes de sanidade de sementes em papel-filtro com sementes inteiras e divididas, e teste em meio BDA com sementes inteiras e divididas. Os resultados deste

trabalho mostram que *D. bryoniae* está associado a sementes de melancia de diferentes origens e qualidades sanitárias, podendo servir como inóculo inicial para grandes epidemias. Os testes realizados em meio ágar-água e vermiculita expandida, e os testes realizados em substrato comercial e areia+solo foram capazes de detectar com melhor consistência a infecção por *D. bryoniae* de sementes dos híbridos de melancia. No Capítulo II foi verificada a ocorrência de infecção latente e sistêmica de *D. bryoniae* em plantas de diferentes cultivares de melancia, através de PCR multiplex utilizando oligonucleotídeos específicos para o patógeno. Foram realizadas análises de PCR multiplex a partir do DNA extraído de plântulas de melancia assintomáticas aos 7, 21 e 40 dias após emergência. Adicionalmente foram realizadas análises de PCR multiplex em segmentos de caules localizados a 0 cm, 5 cm, 15 cm, 30 cm e 60 cm acima do tecido lesionado. Foi comprovada a existência de infecção latente do patógeno nas mudas assintomáticas em todos os cultivares analisados. Foi possível constatar infecção sistêmica em plantas adultas através da detecção do patógeno em segmentos de caule localizados até 60 cm acima do tecido lesionado. No Capítulo III o objetivo foi a proposição e validação de uma escala de avaliação do crestamento-gomoso-do-caule em caules de melancia e melão. Foram instalados cultivos de mini-melancia cv. ‘Smile’ e meloeiro-nobre cv. ‘Sunrise’ em cultivo protegido conduzidos sob diferentes sistemas de condução, visando obter a maior variabilidade de condições dentro deste ambiente. Foram realizadas avaliações da evolução dos sintomas nestas condições. Com base nas observações foi proposta uma escala de avaliação do crestamento-gomoso-do-caule em caules de cucurbitáceas. Foi possível correlacionar a área das lesões com o comprimento das lesões no caule através de regressão linear. A escala de avaliação apresentou precisão de 94,5% de atribuição correta de notas por avaliadores com o auxílio de fita métrica.

ABSTRACT

Detection, latent infection and quantification of *Didymella bryoniae* in watermelon.

Didymella bryoniae is one of the most important pathogens in watermelon crop and other Cucurbitaceae. It can cause cancers, dumping-off, leaf spots and fruit rot. Infected seeds may transmit *D. bryoniae*, acting as a silent and most potentially dangerous strategy of global dispersion of the pathogen and introduction into new areas. In addition, there are evidences of latent and systemic infection in watermelon crop, a verified mechanism for other cucurbits. Gummy-stem-blight is one of the major diseases of watermelon (*Citrullus lanatus*), causing damage throughout the crop cycle. Under protected environment, gummy-stem-blight can become a major problem due to the inoculum perpetuation and changes in disease epidemiology when compared with field conditions, with more stem symptoms despite of leaf symptoms. Despite the great importance of this pathosystem worldwide, there is still a lack of studies related to the watermelon crop in protected environment. Due to these features, it is important to verify the efficiency of detection methods in checking the quality of seed lots. In addition, the epidemiological study and development of tools for disease measurement for these conditions. Therefore, this work had the objective of studying the detection and transmission of *D. bryoniae* in watermelon plants and develop tool for quantification of the Gummy-stem-blight severity in protected environment in watermelon and melon crops. The work was divided in three chapters: In Chapter I, was compared the efficiency of different detection methods of *D. bryoniae* in seeds of six watermelon cultivars. Previously, seeds were submitted to molecular detection of *D. bryoniae* by multiplex PCR. Eight detection tests were performed: two transmission tests on commercial substrate and sand + soil; two transmission tests in agar-water medium and expanded vermiculite; And seed sanity tests on filter-paper with divided and undivided seeds, and BDA medium tests with divided and undivided seeds. The results of this work show that *D. bryoniae* is associated with watermelon seeds of different origins and sanitary qualities, and infested seeds can serve as initial inoculum for large epidemics. The tests on agar-water medium and expanded vermiculite and the tests on commercial substrate and sand + soil detected the seed infection by *D. bryoniae* with better consistency than the other tests. In Chapter II, was verified the existence of latent and systemic infection of *D. bryoniae* in different cultivar of watermelon plants through multiplex PCR using previously developed pathogen-specific oligonucleotides. Multiplex PCR tests were performed on DNA extracted from asymptomatic watermelon

seedlings at 7, 21 and 40 days after emergence. In addition, multiplex PCR tests were performed in stem segments located at 0 cm, 5 cm, 15 cm, 30 cm and 60 cm above the injured tissue. The results confirmed the latent infection of the pathogen in asymptomatic seedlings in all cultivars analyzed. It was possible to identify systemic infection in adult plants by detecting the pathogen in stem segments located up to 60 cm above the injured tissue. In Chapter III, the objective was to evaluate the symptomatology of the gummy-stem-blight on mini-watermelon and muskmelon stems grown protected environment and the suggestion of a disease scale to evaluation of the disease in cucurbit stems. Mini-watermelon “Smile” and muskmelon “Sunrise” were established in protected environment under different breeding systems, to achieve the greatest variety of conditions within this environment. Were measured the symptoms evolution under these conditions. Based on the results, it was suggested a disease assessment scale of gummy-stem-blight in cucurbit stems. It was possible to correlate the area of stem lesions with their length through linear regression. The disease scale presented accuracy of 94.5% of correct assignment of scores by evaluators when aided by a tape measure.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Resultados de testes de PCR em sementes de diferentes cultivares de melancia visando a detecção de infecção latente por <i>Didymella bryoniae</i> . Maringá-PR, 2017.	37
Tabela 1.2– Porcentagem de detecção de <i>Didymella bryoniae</i> em sementes de melancia de diferentes cultivares, através de testes de transmissão em ágar-água, vermiculita, substrato comercial e areia+solo durante dois ciclos de experimentos. Maringá – PR, 2017.	38
Tabela 1.3 - Porcentagem de detecção de <i>Didymella bryoniae</i> em sementes de melancia de diferentes cultivares, através de testes de germinação em papel-filtro e meio BDA, com sementes inteiras e divididas durante dois ciclos de experimentos. Maringá – PR, 2017.	38
Tabela 2.1 – Infecção latente de <i>Didymella bryoniae</i> em plântulas assintomáticas de melancia de diferentes cultivares através de PCR multiplex. Maringá-PR, 2017.	60
Tabela 2.2–Infecção sistêmica de <i>Didymella bryoniae</i> em segmentos de caules de plantas adultas coletados a 0, 5 cm, 15 cm, 30 cm e 60 cm acima da área lesionada. Maringá-PR, 2017.	62
Tabela 3.1- Classificação das notas atribuídas pelos avaliadores sem e com o uso de régua em função das categorias: correta, adjacente superior, adjacente inferior e distante. Maringá-PR, 2017.	81
Tabela 3.2 - Resultados da Estatística Kappa para categorias individuais e índice Kappa geral, com e sem o uso de régua. Maringá-PR, 2017.	82
Tabela 3.3 – Precisão dos avaliadores na atribuição de notas de severidade de Crestamento-gomoso-do-caule em plantas de melão e melancia, sem o uso de régua e com o uso de régua. Maringá-PR, 2017.	83

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 – Estruturas do fungo *Didymella bryoniae* formadas sobre sementes de melancia em teste de sanidade em meio de cultivo BDA. (a) Picnídios e micélio aéreo, aumento 20X; (b) Picnídios e micélio aéreo, aumento 10X; (c) Conídios, aumento 100X; (d) Picnídios rompidos, aumento 50X. Maringá-PR, 2017. 40
- Figura 1.2 - Sintomatologia de crestamento-gomoso-do-caule (*Didymella bryoniae*) em plântulas de melancia: (a) Plantas assintomáticas em ágar-água; (b) plantas assintomáticas em vermiculita expandida; (c) Planta infectada à esquerda e planta assintomática à direita; (d) sementes em fase inicial de germinação apresentando sinais de *D. bryoniae*. Maringá-PR, 2017..... 42
- Figura 1.3 – Sintomatologia de crestamento-gomoso-do-caule (*Didymella bryoniae*) em plântulas de melancia: (a) Sintomas na folha cotiledonar; (b) Folha cotiledonar necrosada com presença de picnídios; (c) Evolução do sintoma a partir da folha cotiledonar até o hipocótilo; (d) Lesões deprimidas no hipocótilo. Maringá-PR, 2017. 45
- Figura 3.1 – Distribuição da ocorrência de sintomas de crestamento-gomoso-do-caule (*D. bryoniae*) nos entrenós dos caules da população de plantas avaliada. Maringá-PR, 2017..... 77
- Figura 3.2 – Distribuição do comprimento das lesões de crestamento-gomoso-do-caule (*D. bryoniae*) em caules de plantas de melancia, agrupados por categorias. Maringá-PR, 2017..... 78
- Figura 3.3 – Regressão linear entre o comprimento da lesões e área de tecido lesionado por crestamento-gomoso-do-caule em plantas de melancia e melão. Maringá-PR, 2017..... 79

SUMÁRIO

REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA.....	11
1 CAPÍTULO I - Eficiência de métodos de detecção de <i>Didymella bryoniae</i> em sementes de melancia.....	24
1.1 RESUMO	25
1.2 ABSTRACT	26
1.3 INTRODUÇÃO	27
1.4 MATERIAL E MÉTODOS	29
1.4.1 Detecção através de PCR Multiplex	30
1.4.2 Testes de sanidade de sementes	32
1.4.3 Testes de transmissão.....	34
1.4.4 Testes de transmissão.....	35
1.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
1.6 CONCLUSÕES.....	47
1.7 REFERÊNCIAS	48
2 CAPÍTULO II – Infecção latente e sistêmica de <i>Didymella bryoniae</i> em melancia	51
2.1 RESUMO	52
2.2 ABSTRACT	53
2.3 INTRODUÇÃO	54
2.4 MATERIAL E MÉTODOS	56
2.4.1 Infecção latente em plantas de melancia.....	56
2.4.2 Infecção sistêmica em plantas de melancia	57
2.4.3 Extração de DNA total.....	58
2.4.4 Reação de PCR multiplex	59
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60

2.6 CONCLUSÕES.....	63
2.7 REFERÊNCIAS	64
3 CAPÍTULO III - Desenvolvimento de escala de avaliação do Crestamento-gomoso-do-caule em caules de mini-melancia e meloeiro-nobre sob nova abordagem metodológica.....	66
3.1 RESUMO	67
3.2 ABSTRACT	68
3.3 INTRODUÇÃO	69
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	72
3.4.1 Sintomatologia do crestamento-gomoso-do-caule.....	72
3.4.2 Escala de Avaliação do crestamento-gomoso-do-caule.....	73
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
3.5.1 Sintomatologia do crestamento-gomoso-do-caule.....	76
3.5.2 Escala de Avaliação do crestamento-gomoso-do-caule.....	79
3.6 CONCLUSÕES.....	85
3.7 REFERÊNCIAS	86

REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA

O fungo *Didymella bryoniae* (Auersw.) (REHM, 1881) (sinons. *Mycosphaerella citrullina* (C.O. Sm.) Grossenb. – *Mycosphaerella melonis* (Pass.) W.F. Chiu & J.C. Walker), anamorfo *Ascochyta cucumis* (Fautrey; Roum [= *Phoma cucurbitacearum* (Fr.: Fr.) Sacc.]) é um parasita necrotrófico facultativo de plantas da família *Cucurbitaceae*. Pertence ao reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, subfilo *Pezizomycotina*, classe *Dothideomycetes*, subclasse *Pleosporomycetidae*, ordem *Pleosporales*, família *Didymellaceae* (ROBERT *et al.*, 2005).

D. bryoniae ocorre em diversas espécies de plantas da família *Cucurbitaceae*. Ao menos 12 gêneros de *Cucurbitaceae* englobando 23 espécies foram identificados como hospedeiros do fungo, incluindo todas as cucurbitáceas cultivadas (KEINATH, 2011; SANTOS *et al.*, 2009; SONG *et al.*, 2004; WOLUKAU *et al.*, 2007). Os principais gêneros de interesse econômico atacados por *D. bryoniae* são *Citrullus*, *Cucumis*, *Cucurbita*, entre outros (KEINATH, 1995). Em ordem decrescente de susceptibilidade se encontram melão, melancia, pepino, abóbora, bucha e chuchu (KEINATH, 2013b;2014).

D. bryoniae é o agente causal do crestamento-gomoso-do-caule em plantas da família *Cucurbitaceae*, na qual é hospedeiro-específico (KEINATH, 2011). A doença também é conhecida por outros nomes como podridão-gomosa, cancro-das-hastes e podridão-negra (GASPAROTTO *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2011). Outros sintomas que caracterizam a infecção nas diversas espécies atacadas são expressos principalmente através de tombamento de plântulas, manchas foliares, podridão negra em frutos e cancos nas hastes e base do caule com exsudação de goma (KEINATH, 2013a; PÉREZ *et al.*, 2012).

O fungo *D. bryoniae* foi inicialmente reportado na Europa em 1869, atacando plantas da família *Bryonia*, e nos dias atuais é globalmente distribuído, sendo encontrado em todos os continentes atacando grande variedade de plantas da família *Cucurbitaceae* (KEINATH, 2011). De forma geral, o patógeno é encontrado com maior frequência em climas úmidos nas regiões temperadas, subtropicais e tropicais. A doença também ocorre em todas as regiões produtoras do Brasil e é altamente devastadora em condições de campo e ambiente protegido (PENHARBEL, 2011; SANTOS e CAFÉ FILHO, 2006; SANTOS *et al.*, 2005; VIDA *et al.*, 2004).

Em algumas das principais espécies de interesse econômico no Brasil, como abóbora, pepino, melão e melancia, todas as partes das plantas podem ser afetadas por *D. bryoniae*, incluindo folhas, pecíolos, pedicelos, flores, pedúnculos, frutos e sementes (KEINATH, 2013a). Porém é observada grande variação de susceptibilidade e expressão dos sintomas entre as diferentes espécies. Os sintomas são observados com maior frequência nas folhas e caules das culturas de melancia, pepino e melão, e nas culturas da abóbora e abobrinha ocorrem em maior frequência nos frutos (AGRIOS, 2005).

Por ser bem adaptado à família *Cucurbitaceae*, *D. bryoniae* é capaz de colonizar rapidamente os tecidos do hospedeiro e se reproduzir abundantemente (KEINATH, 2011). Lesões com crescimento ativo apresentam, geralmente, aspecto encharcado devido à produção de enzimas que degradam as paredes celulares, mais especificamente a poligalacturonase (ZITTER, 1996). O crescimento das lesões nas folhas, caules e pecíolos leva à rápida morte dos tecidos. A planta toda pode murchar e morrer em função do colapso dos tecidos do caule e perda de área foliar. Em ambientes favoráveis ao desenvolvimento do patógeno foram relatados danos de até 60% na cultura da melancia (SANTOS *et al.*, 2005) e até 100% em melão rendilhado (VIDA *et al.*, 2004).

As manchas foliares são geralmente os primeiros sintomas notados e são os mais frequentemente usados na diagnose da doença. Na maioria dos hospedeiros os sintomas foliares surgem a partir das margens das folhas, e na medida que as lesões se expandem, ocorre o coalescimento que resulta no secamento das folhas as quais se tornam quebradiças (KEINATH, 2013a; KUROZAWA *et al.*, 2005). A cor e a forma das lesões foliares variam entre os diferentes hospedeiros, porém algumas características são comuns: Podendo apresentar formato arredondado, romboide ou triangular, particularmente nas lesões originadas a partir dos bordos foliares. As lesões foliares são de coloração creme em pepino, marrom em melão, abóbora e abobrinha, e marrom-escuro em bucha e melancia (KEINATH, 2013a; PÉREZ *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2011). Podem ser notados anéis de coloração variando de marrom claro a escuro que correspondem ao período de crescimento do patógeno quando as folhas se encontram molhadas (KEINATH, 2013a).

No caule as lesões surgem geralmente nos entrenós como manchas encharcadas que se tornam alongadas e necróticas na sua porção central, adquirindo coloração que varia de marrom claro a acinzentado. Com o crescimento, a lesão circunda o caule e pode provocar o fendilhamento do tecido que se torna quebradiço, levando ao surgimento de estrias e

extravasamento de exsudado gomoso de coloração âmbar (AGRIOS, 2005; KEINATH, 2013a; SANTOS *et al.*, 2011).

Os sintomas nos frutos podem se expressar por podridão externa ou interna. Surgem inicialmente como áreas amareladas, irregularmente circulares que se tornam de coloração cinza a marrom e também podem apresentar exsudação na porção central, ao fim a lesão se torna escurecida. As lesões em frutos podem ser inicialmente superficiais, porém especialmente durante o armazenamento, o fungo penetra pelo interior do fruto até a cavidade das sementes (AGRIOS, 2005). Em melão pode ser encontrado crescimento micelial de coloração escura na porção interna dos frutos afetados junto à cavidade das sementes. Em frutos de melancia os sintomas geralmente se iniciam pela porção terminal dos frutos, se expandindo rapidamente por todo o fruto (KEINATH, 2013a).

O crestamento-gomoso-do-caule também pode ocorrer em plantas de melancia e melão ainda na fase de mudas. Nessas condições os sintomas iniciais geralmente são notados como manchas encharcadas no hipocótilo, na região de inserção dos cotilédones. Indicando a própria semente como fonte de inóculo (MUNKVOLD, 2009). Na fase de mudas também podem ocorrer lesões foliares nos cotilédones, as quais geralmente provocam o secamento prematuro destes e posteriormente as lesões migram para o caule. Quando essas plantas sintomáticas são transplantadas para os locais definitivos e sobrevivem, podem desenvolver cancos a partir destas lesões, servindo como inóculo inicial para infecções mais severas (KEINATH, 2013a).

Segundo Keinath (2013a), o crestamento-gomoso-do-caule pode ser diferenciado de antracnose, causado por *Colletotrichum orbiculare*, através das lesões de maior tamanho nas folhas e pecíolos e pela formação de cancro nas hastes. Em folhas de melancia o formato das lesões de antracnose é geralmente angular e irregular, enquanto lesões de crestamento-gomoso-do-caule são geralmente arredondadas. O centro das lesões de antracnose se rompem mais frequentemente do que as lesões de crestamento-gomoso-do-caule.

Em todos os órgãos lesionados são produzidos picnídios distribuídos de forma espaçada a partir do centro das lesões (AGRIOS, 2005). No interior destes, se formam conídios cilíndricos e septados. Ascósporos são mais raramente observados e são produzidos no interior de ascos em estruturas tipo pseudotécio. São uni ou bicelulados, hialinos e arredondados na extremidade (SANTOS *et al.*, 2011). Por ser um fungo necrotrófico, os corpos de frutificação são formados principalmente em áreas necrosadas no centro das lesões em folhas, hastes ou frutos (KEINATH, 2013a). Tanto os conídios como os ascósporos, apresentam vida curta após

a liberação, e são disseminados a curtas distâncias principalmente por respingos de água de chuva, irrigação e contato de máquinas ou ferramentas durante os tratos culturais (AGRIOS, 2005; KEINATH, 2011;2013; VIDA *et al.*, 2004).

As colônias de isolados de *D. bryoniae* cultivadas em meio BDA apresentam micélio aéreo com hifas septadas e profusas, de coloração inicialmente branca nas áreas de crescimento e verde-oliváceo na porção central e sob o meio de cultivo. Com o passar do tempo as colônias vão se tornando escurecidas e surgem os peritécios de coloração castanho-escuro dispersos sobre a colônia (PÉREZ *et al.*, 2012).

O fungo sobrevive em plantas doentes, plantas daninhas ou sementes infectadas. Na ausência do hospedeiro pode sobreviver em restos culturais remanescentes de plantas infectadas, podendo permanecer viável por vários anos no solo. Os frutos doentes geralmente apresentam sementes infectadas (SANTOS *et al.*, 2005). As sementes infectadas contendo esporos do fungo podem causar a infecção primária em novas populações ainda na fase de mudas. Os esporos tipo conídios ou ascósporos constituem o inóculo inicial e são disseminados a curtas distâncias, porém quando presentes nas sementes, apresentam potencial de dispersão a longas distâncias. Após a infecção inicial, os conídios são produzidos em abundância e são os responsáveis por infecções secundárias (AGRIOS, 2005).

D. bryoniae pode estar presente sobre ou mesmo dentro das sementes de plantas da família *Cucurbitaceae* em função da fase de formação na qual ocorreu a infecção. Esta é uma das formas potencialmente mais perigosas e silenciosas de dispersão do patógeno, servindo como fonte de inóculo inicial para a dispersão da doença e introdução em novas áreas (KEINATH, 2002; 2013a; SUDISHA *et al.*, 2006). O inóculo presente nas sementes representa uma das principais formas de introdução da doença em áreas livres, englobando distâncias continentais. Certamente esse mecanismo direto de infecção das sementes para mudas, contribuiu para o aumento da importância de *D. bryoniae* como patógeno em nível mundial. A infecção das sementes pode reduzir a germinação e o vigor, e comprometer a produtividade pela transmissão do patógeno das sementes para as plantas (SUDISHA *et al.*, 2006).

Steekelenburg (1986) demonstrou que frutos de pepino se tornaram infectados após inoculação com *D. bryoniae* ainda na fase de flor aberta. Onde os frutos que se desenvolveram a partir destas flores não apresentaram sintomas externos da infecção. Segundo Gasparotto (2010) plantas de melão que tiveram suas flores expostas a inóculo de *D. bryoniae*, produziram frutos assintomáticos, os quais produziram sementes viáveis e infectadas, expondo um

mecanismo de infecção latente nas sementes dessa cultura (GASPAROTTO *et al.*, 2011). O que foi também observado em sementes de pepino partenocárpico (MOURA, 2013). Isto demonstra o alto grau de especialização do patógeno em cucurbitáceas, nas quais a manifestação inicial dos sintomas está associada ao estresse das plantas hospedeiras (VIDA *et al.*, 2007).

A infecção e o desenvolvimento fúngico de *D. bryoniae* é favorecido por temperaturas entre 20 a 30 °C e umidade relativa em torno de 95%. Porém, segundo Santos *et al.* (2011) a doença pode ocorrer em locais onde a umidade é inferior a 40%, desde que haja molhamento foliar à noite com presença de lâmina de água durante algumas horas, o que é suficiente para a germinação e penetração dos esporos. Plantas de pepino parecem se tornar predispostas ao ataque deste fungo pela infestação previa de besouros ou oídios. Insetos mastigadores como vaquinhas aparentam servir como vetores de *D. bryoniae* entre plantas no campo (AGRIOS, 2005).

O padrão típico de distribuição da doença em cultivo protegido (KEINATH, 2011) ou campo (SANTOS *et al.*, 2005) é o surgimento de um foco inicial com plantas contaminadas ao redor de uma planta morta originada de semente infectada, que serviu como inóculo inicial (KEINATH, 2011). Porém após o estabelecimento, a doença pode crescer de forma exponencial em ambientes favoráveis. Santos *et al.* (2005) observaram área foliar afetada pelo crestamento-gomoso-do-caule variando de 13,6% a 26,5% em campo de melancia em área indene após o estabelecimento inicial de apenas um foco da doença, com decréscimo de 19,2% na produtividade e alto índice de frutos com escaldadura devido à perda da proteção solar exercida pelas folhas. O progresso da doença ocorre mais rapidamente a partir dos 50 dias após o plantio, estágio onde as plantas desenvolvem densa camada de folhas e ramos que retarda a evaporação da água e aumenta o período de molhamento foliar (KEINATH, 1995; SANTOS *et al.*, 2005).

A produção de mudas em cultivo protegido para posterior transplântio apresenta um ambiente altamente favorável ao desenvolvimento do crestamento-gomoso-do-caule a partir de um nível baixo de inóculo inicial em função da alta densidade de plantas e uso de irrigação por aspersão (KEINATH, 1996). Quando são encontrados sintomas da doença nas mudas geralmente já é tarde demais para impedir o avanço da doença. Mesmo com o descarte das plantas sintomáticas e o uso de fungicidas após o transplântio, as demais plantas que se encontravam próximas às sintomáticas já podem estar infectadas e manifestar os sintomas da

doença apenas alguns dias após o transplântio, fato que reforça a importância da detecção precoce de *D. bryoniae* (KOCH e UTKHEDE, 2004).

A detecção da *D. bryoniae* em seus hospedeiros é uma das etapas mais importantes no manejo preventivo da doença. Esse processo pode se tornar particularmente difícil em função das características de infecção latente e assintomática do fungo, que pode permanecer nessas condições desde a semente até enquanto não houver condições favoráveis à expressão dos sintomas no hospedeiro, como a indução de estresses diversos ou alterações fisiológicas e climáticas (GASPAROTTO *et al.*, 2011; VIDA *et al.*, 2007).

Testes de sanidade tradicionais, como papel-filtro e BDA, são capazes de detectar a associação de *D. bryoniae* em sementes das plantas hospedeiras (GASPAROTTO, 2010; MOURA, 2013; SUDISHA *et al.*, 2006). O Ministério da Agricultura, através de suas publicações “Regras para análises de sementes” e “Manual de análises sanitária de sementes”, determina que a detecção de *D. bryoniae* em sementes seja realizada através do método do papel-filtro (“blotter test”) (BRASIL, 2009a;b). No entanto, Gasparotto *et al.* (2009) relatam resultados inconsistentes ou falsos-negativos em teste de papel-filtro na detecção do patógeno em sementes de meloeiro nobre. Estes testes também requerem o isolamento do microrganismo e exame ao microscópio óptico, onde a identificação depende da visualização de estruturas reprodutivas, o que pode ser difícil e consumir muito tempo.

Os métodos moleculares de detecção, por sua vez, podem identificar sequências de DNA genômico específicas a partir de quantidades pequenas do DNA de interesse. Diversas metodologias têm sido desenvolvidas e aprimoradas com base em diversas ferramentas moleculares visando a detecção precoce de *D. bryoniae*. Koch e Utkhede (2004) desenvolveram metodologia onde utilizaram um conjunto de primers que, em reação de PCR múltipla, apresentou grande especificidade e sensibilidade na detecção de *D. bryoniae* em materiais vegetais e amostras de ar contendo apenas esporos. Ha *et al.* (2009) desenvolveram um método que combina a hibridização por captura magnética com PCR em tempo real na detecção simultânea de *D. bryoniae* e *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, onde a hibridização por captura magnética aumentou a eficiência de detecção do patógeno do genótipo RGI em lotes sementes com apenas 0,02% de infestação. Na sequência, Ling *et al.* (2010) desenvolveram sonda e primers para detecção de *D. bryoniae* através de PCR em tempo real com grande sensibilidade para os genótipos RGI e RGII que compreendem a grande maioria das variantes de *D. bryoniae* encontradas no ambiente. Mais recentemente, Yao *et al.* (2016) propuseram um método de

detecção de *D. bryoniae* baseado na metodologia LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) que possibilita a amplificação dos ácidos nucleicos em uma única temperatura. Esse método pode simplificar a detecção precoce de doenças, com o diagnóstico em até 60 minutos (NOTOMI *et al.*, 2000). Apesar das grandes vantagens dos métodos moleculares de detecção, seu amplo uso ainda é proibitivo em função do custo elevado e falta de estrutura para sua realização, principalmente nas regiões produtivas menos desenvolvidas, comumente ocupadas pelo cultivo de melancia e outras cucurbitáceas.

A avaliação do crestamento-gomoso-do-caule em populações de plantas estabelecidas em campo aberto ou cultivo protegido é importante na determinação dos níveis de severidade, verificação da eficiência de medidas de controle como também na avaliação da resistência de plantas para fins de melhoramento genético (MADDEN, 1983).

Diversas metodologias de avaliação da doença já foram propostas considerando as diferentes formas de manifestação dos sintomas provocados por *D. bryoniae* em seus diversos hospedeiros. Os métodos existentes incluem principalmente escalas descritivas para mudas de pepino, melão e melancia (GUSMINI *et al.*, 2002; WEHNER e SHETTY, 2000; WOLUKAU *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 1997), e escalas para sintomas gerais em melancia e melão (SANTOS e CAFÉ-FILHO *et al.*, 2005; SONG *et al.*, 2004; ST AMAND e WEHNER, 2001; TSUTSUMI e DA SILVA, 2004). Mais recentemente Sousa *et al.* (2014) propuseram e validaram uma escala diagramática de seis níveis para avaliação do crestamento-gomoso-do-caule em folhas de melancia, com o objetivo de realizar a quantificação da doença em condições de campo. A avaliação em caules de pepino, visando o ambiente protegido foi abordado por Dusi *et al.* (1994) que propôs uma escala de notas com 5 categorias para avaliação de caules de pepino.

O controle químico do crestamento-gomoso-do-caule é o mais amplamente utilizado, embora na maioria dos casos apresente baixa eficiência, em função da rápida infecção dos tecidos em condições favoráveis ao fungo e da insensibilidade de *D. bryoniae* a alguns princípios ativos, entre os quais estão estrobilurinas e benzimidazóis (THOMAS *et al.*, 2012).

Em geral, epidemias de crestamento-gomoso-do-caule em lavouras de melancia que recebem pulverizações de fungicidas apresentam atraso no progresso da doença em relação a plantas não pulverizadas. A combinação de fungicidas protetivos e sistêmicos reduzem o nível de inóculo inicial, geralmente presente nos restos culturais, e inóculo de meia estação, cujo foco são plantas isoladas infectadas no início do cultivo através das sementes (KEINATH, 1995).

Segundo Keinath (2001) lavouras de melancia sem a aplicação de fungicidas apresentaram redução do peso total de frutos e teor de sólidos solúveis. Enquanto que aplicações frequentes aumentaram a produtividade em função do maior número de frutos comerciais em relação às áreas não tratadas.

O controle de cretamento-gomoso-do-caule é dificultado pelas características de rápida infecção dos tecidos do hospedeiro, devendo ser observada uma estratégia integrada de manejo da doença, como a rotação com culturas não hospedeiras de *D. bryoniae*, eliminação de plantas daninhas, redução da umidade no solo, uso de sementes sadias ou tratadas quimicamente, adoção de variedades ou porta-enxertos resistentes, controle de insetos mastigadores e aplicações frequentes de fungicidas e uso de enxertia empregando porta-enxertos inumes (GASPAROTTO *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2011).

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5th Edition. Elsevier Academic Press, 2005.
- BRASIL. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. 1. ed. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009
- BRASIL. **Regras para análise de sementes**. 1. ed. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009b.
- DUSI, A. N.; TASAKI, S.; VIEIRA, J. Metodologia para avaliação de resistência a *Didymella bryoniae* em melão. **Horticultura Brasileira**, v. 12, n. 1, p. 43–44, 1994.
- GASPAROTTO, F. *et al.* 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.
- GASPAROTTO, F. **Transmissão e controle de *Didymella bryoniae* em meloeiro nobre**. 2010. 169f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Programa de pós-graduação em Agronomia. Universidade Estadual de Maringá, 2010.
- GASPAROTTO, F. *et al.* Infecção latente de *Didymella bryoniae* em meloeiro nobre. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 62–64, 2011.
- GUSMINI, G.; WEHNER, T. C.; HOLMES, G. J. Disease assessment scales for seedling screening and detached leaf assay for gummy stem blight in watermelon. **Cucurbit Genetics Cooperative Report**, v. 25, p. 36–40, 2002.
- HA, Y. *et al.* Simultaneous detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and *Didymella bryoniae* in cucurbit seedlots using magnetic capture hybridization and real-time polymerase chain reaction. **Phytopathology**, v. 99, p. 666–678, 2009.
- 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. Spread of *Didymella bryoniae* from contaminated watermelon seed and transplants in greenhouse and field environments. **Recent Research Developments in Plant Pathology**, v. 1, p. 65–72, 1996.

KEINATH, A. P. Effect of fungicide applications scheduled to control gummy stem blight on yield and quality of watermelon fruit. **Plant Disease**, v. 85, n. 1, p. 53–58, 2001.

KEINATH, A. P. Survival of *Didymella bryoniae* in infested muskmelon crowns in south carolina. **Plant Disease**, v. 86, n. 9, p. 32–38, 2002.

KEINATH, A. P. From native plants in central Europe to cultivated crops worldwide: The emergence of *Didymella bryoniae* as a cucurbit pathogen. **HortScience**, v. 46, n. 4, p. 532–535, 2011.

KEINATH, A. P. Diagnostic guide for gummy stem blight and black rot on cucurbits. **Plant Health Progress**, n. August, 2013a.

KEINATH, A. P. Susceptibility of cucurbit rootstocks to *Didymella bryoniae* and control of gummy stem blight on grafted watermelon seedlings with fungicides. **Plant Disease**, v. 97, n. 8, p. 1018–1024, ago. 2013b.

KEINATH, A. P. Differential susceptibility of nine cucurbit species to the foliar blight and crown canker phases of gummy stem blight. **Plant Disease**, v. 98, n. 2, p. 247–254, fev. 2014.

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.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A.; REZENDE, J. A. M. Doenças das cucurbitáceas. In: KIMATI, H. *et al.* (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Doença das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 293–310.

LING, K. S. *et al.* An improved real-time PCR system for broad-spectrum detection of *Didymella bryoniae*, the causal agent of gummy stem blight of cucurbits. **Seed Science and Technology**, v. 38, n. 3, p. 692–703, 2010.

MADDEN, L. V. Measuring and modeling crop losses at the field level. **Phytopathology**, v. 73, n. 11, p. 1591, 1983.

MOURA, G. S. **Transmissão, detecção e controle de *Didymella bryoniae* em pepino e infecção em melão**. 2013. 134f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Programa de pós-graduação em Agronomia. Universidade Estadual de Maringá, 2013.

MUNKVOLD, G. P. Seed pathology progress in academia and industry. **Annual review of phytopathology**, v. 47, p. 285–311, 2009.

NOTOMI, T. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 12, p. E63, 2000.

PENHARBEL, M. P. **Efeito de sistemas de cultivo e de fungicidas sobre a podridão gomosa (*Didymella bryoniae*) em meloeiro cultivado em ambiente protegido**. 2011. 81f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de pós-graduação em Agronomia. Universidade Estadual de Maringá, 2011.

PÉREZ, J. *et al.* Sintomatología e identificación del agente causal del tizón gomoso del tallo en sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum y Nakai) en la isla de la Juventud. **Protección Vegetal**, v. 27, n. 1, p. 13–18, 2012.

REHM, H. *Didymella bryoniae* (Awd.) Rehm. Ber. **Naturhist. Ver. Augsburg**, p. 26:27, 1881.

ROBERT, V.; STEGEHUIS, G.; STALPERS, J. A. **The MycoBank engine and related databases**. Disponível em: <<http://www.mycobank.org>>. Acesso em: 23 jul. 2016.

SANTOS, G. R. *et al.* Reaction of melon genotypes to the gummy stem blight and the downy mildew. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 160–165, jun. 2009.

SANTOS, G. R. *et al.* Crestamento gomoso do caule da melancia: Etiologia, epidemiologia e medidas de controle. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. 2, p. 52–58, 2011.

SANTOS, G. R.; CAFÉ-FILHO, A. C.; SABOYA, L. M. F. Controle químico do crestamento gomoso do caule em melancia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 155–163, 2005.

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

SANTOS, G. R. DOS *et al.* Progresso do crestamento gomoso e perdas na cultura da melancia. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 2, p. 228–232, jun. 2005.

SONG, R.; GUSMINI, G.; WEHNER, T. C. Screening the watermelon germplasm collection for resistance to gummy stem blight. **Acta Horticulturae**, v. 637, p. 63–68, 2004.

SOUSA, S. C. R. *et al.* Diagrammatic scale for evaluation of gummy stem blight severity in watermelon. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 5, p. 1314–1324, 2014.

ST AMAND, P. C.; WEHNER, T. C. Generation Means Analysis of Leaf and Stem Resistance to Gummy Stem Blight in Cucumber. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 126, n. 1261, p. 95–9995, 2001.

STEEKELENBURG, N. A. M. Factors influencing internal fruit rot of cucumber caused by *Didymella bryoniae*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 92, n. 2, p. 81–91, mar. 1986.

SUDISHA, J. *et al.* 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.

THOMAS, A. *et al.* Relationship between fungicide sensitivity and control of gummy stem blight of watermelon under field conditions. **Plant Disease**, v. 96, n. 12, p. 1780–18=784, 2012.

TSUTSUMI, C. Y.; DA SILVA, N. Screening of melon populations for resistance to *Didymella bryoniae* in greenhouse and plastic tunnel conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 2, p. 171–177, 2004.

VIDA, J. B. *et al.* Controle da podridão gomosa em melão rendilhado em cultivo protegido por sanitização de ferramenta de poda. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 6, p. 626–630, 2004.

VIDA, J. B.; FERNANDES, J.; OLIVEIRA, R. R. Doenças em cultivo protegido: situação atual e perspectivas. In: ZAMBOLIM, L. *et al.* (Eds.). **Doenças em cultivo protegido: situação atual e perspectivas**. Viçosa: Universo, 2007. p. 91–114.

WEHNER, T. C.; SHETTY, N. V. Screening the cucumber germplasm collection for resistance to gummy stem blight in north carolina field tests. **HortScience**, v. 35, n. 6, p. 1132–1140, 2000.

WOLUKAU, J. N. *et al.* Resistance to gummy stem blight in melon (*Cucumis melo* L.) germplasm and inheritance of resistance from plant introductions 157076, 420145, and 323498. **HortScience**, v. 42, n. 2, p. 215–221, 2007.

YAO, X. *et al.* Rapid and sensitive detection of *Didymella bryoniae* by visual loop-mediated isothermal amplification assay. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1372, p. 1–11, 2016.

ZHANG, Y. *et al.* Screening melon (*Cucumis melo*) for resistance to gummy stem blight in the greenhouse and field. **HortScience**, v. 32, n. 1, p. 117–121, 1997.

ZITTER, T. A. Black rot. In: ZITTER, T. A.; THOMAS, C. E.; HOPKINS, D. L. (Eds.). **Compendium of Cucurbit Diseases**. St. Paul, MN.: American Phytopathological Society Press, 1996.

CAPÍTULO I

Eficiência de métodos de detecção de *Didymella bryoniae* em sementes de melancia

1.1 RESUMO

Eficiência de métodos de detecção de *Didymella bryoniae* em sementes de melancia. O crestamento-gomoso-do-caule causado pelo fungo *Didymella bryoniae*, é uma das principais doenças da cultura da melancia (*Citrullus lanatus*), provocando danos ao longo de todo o ciclo da cultura. A transmissão via sementes é uma das formas de dispersão global e introdução do patógeno em novas áreas. A escolha do método de detecção adequado é importante na verificação da qualidade de lotes de sementes e para evitar resultados considerados falsos negativos. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de comparar a eficiência de diferentes métodos de detecção *D. bryoniae* em sementes de seis cultivares de melancia. As sementes foram submetidas previamente a detecção molecular de *D. bryoniae* através de PCR multiplex. Na sequência foram comparados quanto à sua capacidade de detecção, os testes de transmissão em substrato comercial e areia+solo; testes de transmissão em meio ágar-água e vermiculita expandida; e testes de sanidade de sementes em papel-filtro com sementes inteiras e divididas, e teste em meio BDA com sementes inteiras e divididas. Foram utilizadas sementes de melancia dos cultivares ‘Smile’, ‘PX2007’, ‘Crimpia’, ‘Fairfax’, ‘Crimson Select’ e ‘Landrace’. O fungo *D. bryoniae* foi detectado em todos os cultivares examinados pelos testes de transmissão realizados em substrato comercial, areia+solo, ágar-água e vermiculita expandida. A taxa de transmissão detectada variou de 10,5 a 55% em substrato comercial e de 1% a 50% em areia+solo; variou de 5% a 20% em ágar-água e de 3 a 19% em vermiculita expandida. O teste em papel-filtro não detectou *D. bryoniae* associado a nenhum dos cultivares, apresentando resultado falso-negativo para este patógeno. O teste em BDA detectou o patógeno apenas no cultivar com maior infecção de *D. bryoniae*, apresentando resultados negativos nos cultivares com baixa infecção de *D. bryoniae* detectada pelos demais testes realizados. Os resultados deste trabalho mostram que *D. bryoniae* está associado a sementes de melancia de diferentes origens e qualidades sanitárias, podendo servir como inóculo inicial para grandes epidemias. Os testes realizados em papel-filtro e meio BDA não foram recomendados na avaliação de *D. bryoniae* em função de resultados falsos-negativos e baixa capacidade de detecção. Os testes de transmissão em meio ágar-água, vermiculita expandida, substrato comercial e areia+solo podem ser utilizados para a detecção de *D. bryoniae* em sementes de melancia.

Palavras-chave: *Citrullus lanatus*, Crestamento-gomoso-do-caule, patologia de sementes.

1.2 ABSTRACT

Efficiency of detection methods of *Didymella bryoniae* in watermelon seeds. Gummy-stem-blight (*Didymella bryoniae*) is one of the main watermelon (*Citrullus lanatus*) diseases, causing damage throughout the entire crop cycle. Transmission through seeds is considered a global form of dispersion and introduction of the pathogen into new areas. The correct choice of the detection method is important to verify the seed lots quality and false-negative results avoidance. Thus, the objective of this work was to compare the efficiency of different detection methods of *D. bryoniae* in seeds of six watermelon cultivars. Molecular detection of *D. bryoniae* in seeds were made by multiplex PCR. Eight tests were carried out to detect the pathogen, composed of transmission tests on commercial substrates and sand+soil; transmission tests in agar-water medium and expanded vermiculite; seed sanity tests on filter paper with divided and undivided seeds, and test in PDA medium with divided and undivided seeds. Were used watermelon seeds of cultivars ‘Smile’, ‘PX2007’, ‘Crimpia’, ‘Fairfax’, ‘Crimson Select’ and ‘Landrace’. The positive detection of *D. bryoniae* occurred in all cultivars examined by the transmission tests performed on commercial substrates, sand + soil, agar-water and expanded vermiculite. The tests showed the highest transmission rate, which ranged from 10.5 to 55% in commercial substrate and from 1% to 50% in sand + soil; the tests showed transmission from 5% to 20% in agar-water and from three to 19% in expanded vermiculite. Filter-paper test did not detect *D. bryoniae* in any cultivars, possibly presenting false-negative results for this pathogen. The PDA test detected the pathogen only in cultivar with the highest infection of *D. bryoniae*, showing negative results in cultivars with low *D. bryoniae* association, detected by the other tests. The results of this work show that *D. bryoniae* is associated with watermelon seeds of different origins and sanitary qualities, and might serve as initial inoculum for large epidemics. Tests performed on agar-water medium and expanded vermiculite, and the tests carried out on commercial substrate and sand + soil can be used to detect *D. bryoniae* in watermelon seeds.

Keywords: *Citrullus lanatus*, Gummy-stem-blight, seed pathology.

1.3 INTRODUÇÃO

A melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. e Nakai) é uma das cucurbitáceas mais cultivadas no Brasil. De origem africana, se destaca por suas características nutricionais e também pelo seu valor comercial (FILGUEIRA, 2008). Em 2014 foram produzidas no Brasil 2.171.288 t da fruta, em uma área de 94.929 ha, com valor bruto da produção de 1,2 bilhões de reais (IBGE, 2014).

O crestamento-gomoso-do-caule, causado pelo fungo ascomiceto *Didymella bryoniae* (Auersw.) (REHM, 1881) (sinon. *Mycosphaerella citrullina* [C.O. Sm.] Grossenb. – *Mycosphaerella melonis* [Pass.] W.F. Chiu & J.C. Walker,) anamorfo *Ascochyta cucumis* (Fautrey; Roum [= *Phoma cucurbitacearum* {Fr.: Fr.} Sacc.]), se destaca como um dos problemas fitossanitários mais limitantes à produção e qualidade de cucurbitáceas no Brasil (KUROZAWA *et al.*, 2005). Foram relatados danos de até 60% na cultura da melancia (SANTOS e CAFÉ FILHO, 2005) e até 100% em melão rendilhado (GASPAROTTO *et al.*, 2011; VIDA *et al.*, 2007; VIDA *et al.*, 1993).

D. bryoniae pode infectar sementes de *Cucurbitaceae* em todas as fases fisiológicas de formação das sementes. Esta é uma das formas potencialmente mais perigosas e silenciosas de dispersão do patógeno, servindo como fonte de inóculo inicial para a dispersão da doença e introdução em novas áreas (KEINATH, 2002;2013; SUDISHA *et al.*, 2006). A infecção das sementes pode reduzir a germinação, vigor e comprometer a produtividade pela transmissão do patógeno para as plantas (SUDISHA *et al.*, 2006). O inóculo presente nas sementes representa uma das principais formas de introdução da doença em áreas livres, permitindo a disseminação da doença a distâncias continentais. A transmissão da doença das sementes para mudas, contribuiu para o aumento da importância de *D. bryoniae* como patógeno em nível mundial.

Todas as cucurbitáceas cultivadas são susceptíveis ao crestamento-gomoso-do-caule, porém apresentam diferentes níveis de susceptibilidade entre as espécies e cultivares (KEINATH, 2013a;2014). Os sintomas mais frequentes são tombamento de plântulas, lesões nas hastes na região do colo da planta com exsudação de goma e manchas foliares (KEINATH, 2013a; PÉREZ *et al.*, 2012). *D. bryoniae* causa infecção sistêmica e latente em sementes, já comprovados para sementes de melão (GASPAROTTO, 2010) e pepino (MOURA, 2013). O

que demonstra o alto grau de especialização do patógeno em cucurbitáceas, na qual a manifestação inicial dos sintomas está associada ao estresse das plantas hospedeiras, que ocorre principalmente no transplântio das mudas e em função de adversidades ambientais ou nutricionais (VIDA *et al.*, 2007).

A associação de *D. bryoniae* às sementes de cucurbitáceas é relatada na literatura como ocorrendo em alta frequência, porém danos diretos como a redução da germinação e vigor são menos frequentes (LEE *et al.*, 1984; CHOI *et al.*, 2010; GASPAROTTO *et al.*, 2009; MOURA, 2013; SUDISHA *et al.*, 2006). O principal papel das sementes dentro do ciclo desse patógenos parece ser de veículo para sua disseminação para novos cultivos. O inóculo presente nas sementes representa uma das principais formas de introdução da doença em áreas livres, englobando distâncias continentais.

Grande parte das sementes dos híbridos de melancia de alta performance cultivados no Brasil são importadas de diversos países, como EUA, Chile e Japão. E podem representar uma forma global de dispersão de *D. bryoniae* quanto não são tomadas medidas eficientes para garantir a qualidade sanitária das sementes ou os tratamentos fitossanitários adequados para minimizar essa dispersão (KEINATH, 2011; MUNKVOLD, 2009; NGUGI e SCHERM, 2006).

O Ministério da Agricultura, determina que a detecção de *D. bryoniae* em sementes seja realizada através do método do papel-filtro (“blotter test”) (BRASIL, 2009a;b). O método é de fácil aplicação na rotina laboratorial e permite resultados após oito dias, através da avaliação visual de sinais do patógeno nas sementes. Porém resultados inconsistentes e falsos-negativos são relatados para o patossistema *D. bryoniae* em sementes de algumas espécies (GASPAROTTO *et al.*, 2009), o que pode levar a falsos diagnósticos e favorecer a dispersão de lotes infectados.

Existe uma carência de informações a respeito da eficiência de testes de sanidade alternativos na detecção de *D. bryoniae* em sementes de melancia. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi de comparar a eficiência de métodos de detecção de *D. bryoniae* em sementes de diversos cultivares de melancia.

1.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no período de novembro de 2014 a dezembro de 2015 nas dependências do campus sede da Universidade Estadual de Maringá (UEM) município de Maringá, Estado do Paraná.

Foram comparados métodos tradicionalmente utilizados na detecção de patógenos associados a sementes: Teste em papel-filtro com sementes inteiras e divididas; teste em meio de cultivo BDA (Batata-dextrose-ágar) com sementes inteiras e divididas; teste de sintomas em plântulas, conduzidos em substrato comercial e areia; testes de sintomas em plântulas conduzidos em meio estéril contendo ágar-água e vermiculita expandida (Gasparotto *et al.*, 2009; Sudisha *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 1984; Neergard, 1977).

Foram submetidos aos testes de detecção seis lotes de sementes de melancia. As sementes dos cultivares ‘Smile’, ‘PX2007’, ‘Crimpia’, ‘Fairfax’, ‘Crimson Select’ foram adquiridas em casas agropecuárias da cidade de Maringá-PR. Um lote de sementes de melancia foi obtido diretamente de um pequeno produtor que multiplica suas próprias sementes há várias gerações, a qual foi nomeada como ‘Landrace’. O Quadro 1.1 mostra a origem e o tipo de fruto dos cultivares utilizados.

Quadro 1.1– Características das amostras de sementes utilizadas nos testes de detecção de *D. bryoniae* em sementes e plântulas de melancia. Maringá-PR, 2017.

Amostras	Tipo do fruto	Fabricante	Origem
Smile	Mini	Takii seed	Japão
PX2007	Alongado	Monsanto Chile S.A.	Chile
Crimpia	Oval	Sementes Sakama	Coréia
Fairfax	Alongado	Feltrin Sementes LTDA	Brasil
Crimson Select	Oval	Agristar	EUA
Landrace	Oval	--	Brasil

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos inteiramente casualizados. Os resultados obtidos nos testes de sanidade e transmissão foram submetidos à análise estatística

pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade, e as médias comparadas entre si, através do programa estatístico ASSISTAT (SILVA e AZEVEDO, 2016).

Cada teste de transmissão foi repetido duas vezes. No segundo ciclo de experimentos foram utilizados lotes comerciais diferentes do primeiro ciclo, exceto para o cultivar ‘Crimpia’, no qual foi utilizado o mesmo lote do primeiro experimento em função à indisponibilidade nos estabelecimentos comerciais. O cultivar ‘Landrace’, que no primeiro experimento foi obtido diretamente do produtor, no segundo experimento foi obtido a partir do cultivo e colheita das sementes do primeiro lote.

1.4.1 Detecção através de PCR Multiplex

Os lotes de sementes dos seis cultivares analisados foram submetidos previamente à detecção molecular de *D. bryoniae* através da reação em cadeia da polimerase (PCR) por meio de primers específicos para o patógeno, previamente desenvolvidos por Koch e Utkhede (2004).

1.4.1.1 Extração e purificação de DNA total

As análises foram realizadas no laboratório do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Inicialmente foram utilizadas 200 sementes de cada uma dos cultivares ‘Smile’, ‘PX2007’, ‘Crimpia’, ‘Fairfax’, ‘Crimson Select’ e ‘Landrace’. As sementes foram inicialmente lavadas com água e detergente neutro para remoção de resíduos aderidos à casca e tratamentos químicos.

As sementes de cada cultivar foram separadas em quatro sub-amostras de 50 sementes, e em seguida foi realizada a trituração das sementes em liquidificador e maceração em almofariz contendo nitrogênio líquido. A maceração foi repetida três vezes até o macerado obter consistência de pó fino. Foram processadas o total de 25 amostras, sendo 24 amostras de macerado de sementes (6 cultivares x 4 repetições) e uma amostra contendo macerado de colônia virulenta de *D. bryoniae* obtida de planta de melancia usada como controle positivo.

O DNA foi isolado e purificado utilizando o kit de purificação em coluna de sílica DNeasy plant mini kit (Qiagen inc.). Foi transferido 100 mg do macerado para microtubo de 1,5 mL. A este foi adicionado 400 µL da solução tampão AP1 e 4 µL de RNase A, procedendo-se agitação em vortex com posterior incubação a 65 °C durante 10 min. Na sequência foram adicionados 130 µL da solução P3 e as amostras incubadas no gelo durante 5 min. A amostra

foi centrifugada a 14000 rpm durante 5 min e o sobrenadante foi transferido para mini-coluna de sílica montada dentro de microtubo coletor de 2 mL. O conjunto foi centrifugado a 14000 rpm durante 5 min. O líquido que passou pela mini-coluna, armazenado no tubo coletor, foi transferido para novo microtubo e a este adicionado 1,5 volumes da solução AW1. Após, 650 µL da mistura foi transferida para nova mini-coluna de sílica montada dentro de um microtubo coletor de 2 mL. O conjunto foi centrifugado a 8000 rpm e o líquido passante foi descartado. Este passo foi repetido duas vezes. A mini-coluna contendo o DNA aderido foi transferida para novo tubo coletor e a este foi adicionado 500 µL da solução AW2. O conjunto foi centrifugado a 8000 rpm por 1 min. Mais 500 µL da solução AW2 foi adicionada e o conjunto foi centrifugado a 14000 rpm por 2 min. A mini-coluna contendo o DNA purificado foi transferida para dentro de microtubo de 1,5 mL e a esta adicionada 100 µL da solução de eluição. Após 5 minutos de incubação o conjunto foi centrifugado a 8000 rpm durante 1 min, obtendo-se o DNA purificado contido no microtubo. As amostras foram armazenadas a -20 °C para posterior processamento.

1.4.1.2 Reação de PCR multiplex

As amostras com o DNA total extraído foram submetidas à reação em cadeia da polimerase, em reações múltiplas simultâneas (PCR Multiplex). Como controle negativo foi utilizado mix de reação sem a adição de DNA.

Foram utilizados os oligonucleotídeos específicos para detecção de *D. bryoniae* denominados D7S (5'-CTACAATTGCGGGCTTTGC), D6 (5'-CGCCGATTG GACAAA ACTTAAA) e UNLO28S22 (5'-GTTTCTTTTCCTCCGCT TATTGATATG), em reação múltipla simultânea. Na presença de DNA de *D. bryoniae* estes oligonucleotídeos formam amplicons de 535 pares de bases (UNLO28S22 + D7S) e 461 pares de bases (UNLO28S22 + D6) (KOCH e UTKHEDE, 2004). Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA).

Para as reações foi utilizado termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient com microtubos de 200 µL contendo 5 µL do DNA total extraído, 11,85 µL de água ultra-pura, 2,5 µL de solução tampão 10X, 1,25 µL de MgCl₂, 0,25 µL de cada DNTP, 1 µL de cada um dos primers (15 pmol) e 0,4 µL da enzima Taq polimerase Platinum. A reação de PCR foi realizada em 31 ciclos com temperaturas de 94 °C por 45 segundos, 63 °C por 45 segundos e 72 °C por 45 segundos. Antes do início do primeiro ciclo as amostras foram submetidas a 94 °C durante

3 minutos para ativação da enzima Taq polimerase e ao final um período extra de extensão de 10 minutos a 72°C.

Os amplicons de DNA foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e submerso em tampão TBE. A eletroforese foi realizada a 100 V durante 30 min. Ao final do processo o gel foi visualizado e fotografado sob luz ultravioleta.

1.4.2 Testes de sanidade de sementes

1.4.2.1 Teste em papel-filtro com sementes inteiras

No teste de sanidade em papel-filtro, foi utilizada metodologia descrita por Neergard (1977). As sementes de cada cultivar foram distribuídas em caixas de acrílico tipo “gerbox” contendo três folhas de papel filtro umedecidas por água destilada esterilizada. Foram utilizadas 8 repetições com 25 sementes por repetição, totalizando 200 sementes por tratamento. As caixas foram mantidas em câmara de incubação tipo BOD com temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ sob luz fluorescente em ciclos alternos de 12 h de luz /12 h de escuro por período de 24 h. Após esse período, as caixas foram transferidas para freezer com temperatura $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ por período de 24 h. Em seguida o material retornou às mesmas condições de temperatura e luminosidade inicial, onde foram mantidas por 7 dias.

Após esse período, as sementes foram examinadas individualmente quanto a presença de quaisquer estruturas do patógeno, com observação ao microscópio óptico com o objetivo de identificação do fungo associado. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes apresentando quaisquer sinais de *D. bryoniae*.

1.4.2.2 Teste em papel-filtro com sementes divididas

No teste de sanidade em papel-filtro com sementes divididas, foi utilizada metodologia descrita por Lee *et al.* (1984). As sementes foram previamente lavadas por cinco vezes em água destilada esterilizada e na sequência embebidas em água destilada esterilizada por período de 2 h. Em seguida, as sementes foram separadas em casca e perisperma mais embrião. As partes separadas foram distribuídas lado a lado em caixas de acrílico tipo “gerbox” contendo três folhas de papel filtro umedecidas com água destilada esterilizada. Foram utilizadas 8 repetições com 25 sementes por repetição, totalizando 200 sementes por tratamento. As caixas foram

mantidas em câmara de incubação tipo BOD com temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob luz fluorescente em ciclos alternos de 12 h de luz /12 h de escuro por período de 7 dias.

Após esse período, as sementes foram examinadas individualmente quanto a presença de quaisquer estruturas do patógeno (picnídios) com observação ao microscópio óptico com o objetivo de identificação do fungo associado. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes apresentando sinais de *D. bryoniae*.

1.4.2.3 *Teste em BDA com sementes inteiras*

O teste em substrato batata-dextrose-ágar (BDA) foi realizado de acordo com a metodologia de Sudisha *et al.* (2006). As sementes foram previamente lavadas com detergente para a remoção de quaisquer resíduos aderidos à casca e tratamentos químicos. Na sequência foram desinfestadas com hipoclorito de sódio (2%) durante 5 min, e em seguida foram lavadas três vezes em água destilada esterilizada. Após a secagem superficial das sementes, estas foram distribuídas em placas de Petri contendo meio BDA. Foram utilizadas 8 repetições com 25 sementes por repetição, totalizando 200 sementes por tratamento. As placas foram mantidas em câmara de incubação tipo BOD com temperatura de $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob luz fluorescente em ciclos alternos de 12 h de luz /12 h de escuro por período de 7 dias.

Após esse período, as sementes foram examinadas individualmente quanto a presença de quaisquer estruturas do patógeno, com observação ao microscópio óptico com o objetivo de identificação do fungo associado. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes apresentando quaisquer sinais de *D. bryoniae*.

1.4.2.4 *Teste em BDA com sementes divididas*

No teste em BDA com sementes divididas, as sementes foram separadas em casca mais endosperma, de acordo com o descrito no teste em papel-filtro com sementes divididas. As partes das sementes foram distribuídas lado a lado nas mesmas condições descritas no teste em BDA com sementes inteiras.

Após a incubação, as sementes foram examinadas individualmente quanto a presença de quaisquer estruturas do patógeno, com observação ao microscópio óptico com o objetivo de identificação do fungo associado. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes apresentando quaisquer sinais de *D. bryoniae*.

1.4.3 Testes de transmissão em ambiente estéril

1.4.3.1 *Teste de transmissão em ágar-água*

No teste de transmissão em ágar-água foram utilizados tubos de ensaio de vidro, com dimensões de 18 x 180 mm. Os tubos foram previamente lavados e autoclavados a 120 °C durante 20 min. A cada tubo foi adicionado 10 mL de solução contendo água destilada e ágar na concentração de 1%. Os tubos foram selados individualmente e foi realizada nova autoclavagem a 120 °C durante 20 min com os tubos na posição vertical.

As sementes de todos os lotes passaram por etapa prévia de lavagem com detergente para a remoção de quaisquer resíduos aderidos à casca e tratamentos químicos. Na sequência, 100 sementes de cada tratamento foram desinfestadas com hipoclorito de sódio (2%) durante 5 min, e em seguida foram lavadas três vezes em água destilada esterilizada. Em ambiente estéril, foi adicionada uma semente a cada tubo de ensaio, totalizando quatro repetições de 25 sementes. Os tubos foram lacrados com filme de PVC e mantidos em câmara de incubação, sob luz fluorescente em ciclos alternos de 12 h de luz /12 h de escuro por período de 45 dias.

Os tratamentos foram avaliados diariamente quanto a presença de sintomas ou sinais do patógeno nas plântulas. Os resultados foram expressos em porcentagem acumulada de plantas apresentando quaisquer sintomas de crestamento-gomoso-do-caule ou sinais do patógeno *D. bryoniae*.

1.4.3.2 *Teste de transmissão em vermiculita expandida*

No teste de transmissão em vermiculita expandida foram utilizados tubos de ensaio de vidro, com dimensões de 18 x 180 mm. Os tubos foram previamente lavados e autoclavados a 120 °C durante 20 min. A cada tubo foi adicionado 10 cm³ de vermiculita expandida e 5 mL de água destilada. Os tubos foram selados individualmente e foi realizada nova autoclavagem a 120 °C durante 20 min com os tubos na posição vertical.

As sementes de todos os lotes passaram por etapa prévia de lavagem com detergente para a remoção de quaisquer resíduos aderidos à casca e tratamentos químicos. Na sequência, 100 sementes de cada tratamento foram desinfestadas com hipoclorito de sódio (2%) durante 5 min, e em seguida foram lavadas três vezes em água destilada esterilizada. Em ambiente estéril, foi adicionada uma semente a cada tubo de ensaio, totalizando quatro repetições de 25 sementes.

Os tubos foram lacrados com filme de PVC e mantidos em câmara de incubação, sob luz fluorescente em ciclos alternos de 12 h de luz /12 h de escuro por período de 45 dias.

Os tratamentos foram avaliados diariamente quanto a presença de sintomas ou sinais do patógeno nas plântulas. Os resultados foram expressos em porcentagem acumulada de plantas apresentando quaisquer sintomas de crestamento-gomoso-do-caule ou sinais de *D. bryoniae*.

1.4.4 Testes de transmissão em casa de vegetação

1.4.4.1 Teste de transmissão em substrato comercial

No teste de transmissão em substrato comercial, foi utilizada metodologia descrita por Gasparotto *et al.* (2009). Utilizou-se substrato à base de casca de pinus da marca Plant Max HF. O mesmo foi autoclavado a 120 °C durante duas horas, o processo foi repetido após 24 horas; 48 h após a última autoclavagem o substrato foi distribuído em bandejas plásticas de 100 células (16 cm² de abertura superior e 10 cm de profundidade cada célula). Em seguida foi realizada a semeadura, dispendo-se as sementes na posição horizontal a 1 cm de profundidade no substrato. Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento.

As bandejas foram mantidas em casa de vegetação semi-climatizada com irrigação automática com água de torneira ajustada de acordo com a necessidade da cultura. Após a emergência, as plantas foram avaliadas diariamente quanto à presença de sintomas do crestamento-gomoso-do-caule durante período de 60 dias. Após cada avaliação as plantas sintomáticas foram retiradas para evitar contaminação secundária das mudas adjacentes. Os resultados foram expressos em porcentagem acumulada de plantas apresentando quaisquer sintomas de crestamento-gomoso-do-caule.

1.4.4.2 Teste de transmissão em areia+solo

No teste de transmissão em areia lavada, a mesma foi autoclavada seguindo o mesmo procedimento adotado no substrato comercial (GASPAROTTO *et al.*, 2009). Após o período de descanso de 48h a areia foi distribuída em caixas plásticas de dimensões 40 x 28 x 10 cm. Em seguida foi realizada a semeadura, dispendo-se as sementes na posição horizontal a 1 cm de profundidade na areia, totalizando 50 sementes por caixa. Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento.

As bandejas foram mantidas em casa de vegetação semi-climatizada com irrigação automática com água de torneira. Após a emergência, as plantas foram avaliadas diariamente quanto à presença de sintomas de crestamento-gomoso-do-caule durante período de 60 dias. Após cada avaliação as plantas sintomáticas foram retiradas para evitar contaminação secundária das mudas adjacentes. Aos 30 dias após a emergência, as plantas remanescentes assintomáticas foram transferidas para novas caixas contendo mistura de 50% areia lavada + 50% solo argiloso, com o objetivo de aumentar o estresse das plantas e favorecer a expressão de sintomas, onde continuaram sendo avaliadas por mais 30 dias. Os resultados foram expressos em porcentagem acumulada de plantas apresentando quaisquer sintomas de crestamento-gomoso-do-caule.

1.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do teste de PCR são expressos na Tabela 1.1. Em todos os seis cultivares analisados houve confirmação da presença de DNA de *D. bryoniae* associado às sementes. Nos cultivares ‘Smile’, ‘Fairfax’ e ‘Landrace’, os resultados foram positivos em 100% das amostras. Nos cultivares ‘PX2007’, ‘Crimpia’ e ‘Crimson Select’ os resultados foram positivos em 75% das amostras avaliadas.

Tabela 1.1 – Resultados de testes de PCR em sementes de diferentes cultivares de melancia visando a detecção de infecção latente por *Didymella bryoniae*. Maringá-PR, 2017.

Cultivares	Sub-amostras*				Total
	I	II	III	IV	
Padrão +	+ ¹	+	+	+	---
Smile	+	+	+	+	4/4
PX2007	+	-	+	+	3/4
Crimpia	+	-	+	+	3/4
Fairfax	+	+	+	+	4/4
Crimson Select	-	+	+	+	3/4
Landrace	+	+	+	+	4/4

¹Os sinais ‘+’ e ‘-’ representam amostras com resultado positivo e negativo, respectivamente, para presença de *D. bryoniae* na sub-amostra avaliada. *Cada sub-amostra representa uma repetição e foi composta por 50 sementes.

Os resultados da análise molecular mostram que existe associação de *D. bryoniae* mesmo em sementes de melancia assintomáticas e de alto padrão comercial, evidenciando o alto nível de especialização do patógeno. Porém é de grande importância associar a presença do patógeno com seu potencial de danos em sementes, mudas e condições de cultivo na cultura da melancia. Dessa forma, os testes de sanidade e transmissão são ferramentas importantes nesse diagnóstico, o qual não é fornecido pela detecção molecular. Esse fato se torna mais importante quando se considera a característica de infecção latente de *D. bryoniae* em seus hospedeiros (GASPAROTTO *et al.*, 2011; MOURA, 2013) o qual dificulta relacionar a presença de DNA fúngico nas sementes com a severidade de expressão dos sintomas da doença.

Os resultados obtidos nos testes de sanidade de sementes e nos testes de detecção em ambiente estéril e em casa de vegetação encontram-se nas Tabelas 1.2 e 1.3.

Tabela 1.2– Porcentagem de detecção de *Didymella bryoniae* em sementes de melancia de diferentes cultivares, através de testes de transmissão em ágar-água, vermiculita, substrato comercial e areia+solo durante dois ciclos de experimentos. Maringá – PR, 2017.

Cultivar	Ensaio	Método			
		Ágar-água	Vermiculita	Substrato	Areia+solo
		-----%-----			
Smile	1	6,0 a ¹	6,0 a	13,0 b	10,0 ab
	2	5,0 ab	4,0 a	15,0 b	12,0 ab
Px2007	1	6,0 ab	5,0 a	11,0 b	7,5 ab
	2	6,0 ab	4,0 a	16,5 b	6,0 ab
Crimpia	1	12,0 b	9,0 ab	10,5 ab	4,0 a
	2	13,0 b	6,0 ab	11,5 ab	1,0 a
Fairfax	1	5,0 a	5,0 a	18,5 b	8,5 ab
	2	5,0 ab	3,0 a	24,5 b	6,0 ab
Crimson	1	6,0 ab	4,0 a	14,0 b	9,0 ab
	2	6,0 a	5,0 a	21,0 b	10,0 ab
Landrace	1	16,0 a	14,0 a	37,0 b	30,5 ab
	2	20,0 a	19,0 a	55,0 b	50,0 ab
Media		8,8	7	20,6	12,9

¹Médias acompanhadas das mesmas letras nas linhas não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

Tabela 1.3 - Porcentagem de detecção de *Didymella bryoniae* em sementes de melancia de diferentes cultivares, através de testes de germinação em papel-filtro e meio BDA, com sementes inteiras e divididas durante dois ciclos de experimentos. Maringá – PR, 2017.

Cultivar	Ensaio	Método			
		Papel filtro		BDA	
		Inteiras	Divididas	Inteiras	Divididas
		-----%-----			
Smile	1	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0	0,0	0,0	0,0
Px2007	1	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0	0,0	0,0	0,0
Crimpia	1	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0	0,0	0,0	0,0
Fairfax	1	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0	0,0	0,0	0,0
Crimson	1	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0	0,0	0,0	0,0
Landrace	1	0,0 a ¹	0,0 a	9,0 b	7,3 ab
	2	0,0 a	0,0 a	10,3 b	8,8 ab
Media		0	0	1,6	1,3

¹Médias acompanhadas das mesmas letras nas linhas não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

Nos testes tradicionais de sanidade em papel-filtro com sementes inteiras e com sementes divididas não foi detectada a presença do fungo *D. bryoniae* associado às sementes em nenhuma das sementes dos cultivares de melancia avaliados. Este teste não é adequado para a detecção de *D. bryoniae* em melancia, uma vez que os demais testes realizados foram capazes de detectar, mesmo com considerável variação de sensibilidade, o patógeno em sementes comerciais consideradas como padrão de sanidade. Gasparotto *et al.* (2009) encontraram resultados similares trabalhando com o teste do papel-filtro para detecção de *D. bryoniae* em sementes de meloeiro nobre, obtendo resultados negativos mesmo em lotes com comprovada infecção pelo patógeno. Enquanto Lee *et al.* (1984) trabalhando com *D. bryoniae* em sementes de melão e abóbora, detectaram infecção variando de 0,5% a 38% nos lotes de sementes analisados utilizando a mesma metodologia.

Nos testes de sanidade realizados em meio BDA com sementes inteiras e sementes divididas, foi detectado o fungo *D. bryoniae* em apenas um lote de sementes dentre os seis lotes avaliados. A detecção ocorreu tanto no teste com sementes inteiras quanto com sementes divididas apenas no cultivar 'Landrace', considerado neste trabalho como padrão de infecção de *D. bryoniae*, devido à alta porcentagem de detecção verificada pelos demais testes utilizados neste trabalho. No primeiro ensaio a porcentagem de detecção foi de 9% para sementes inteiras e 7,3% para sementes divididas. E no segundo ensaio, 10,3% para sementes inteiras e 8,8% para sementes divididas. Nos demais cultivares de origem comercial os resultados foram negativos.

Resultados como este indicam uma menor sensibilidade do teste de sanidade em meio BDA na detecção de *D. bryoniae* em sementes. Isso pode ocorrer devido às características do fungo já abordados por outros autores como seu período de infecção latente em hospedeiros como melão (GASPAROTTO *et al.*, 2011) e pepino (MOURA, 2013), e também pelo crescimento vegetativo lento em meio de cultivo, que pode ser superado por fungos contaminantes como *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus* e outros (LUCCA FILHO, 1991).

As estruturas de *D. bryoniae* predominantemente encontradas no teste de sanidade em meio BDA e que permitiram sua identificação, foram picnídios de coloração variando de marrom claro a escuros, formados entre a casa e a mucilagem da semente ou sobre esta, recobertos por crescimento esparso de micélio aéreo de coloração branca, e coloração verde olivácea quando crescido no meio de cultivo. Os picnídios continham conídios hialinos mono ou bicelulados formados em número abundante (Figura 1.1).

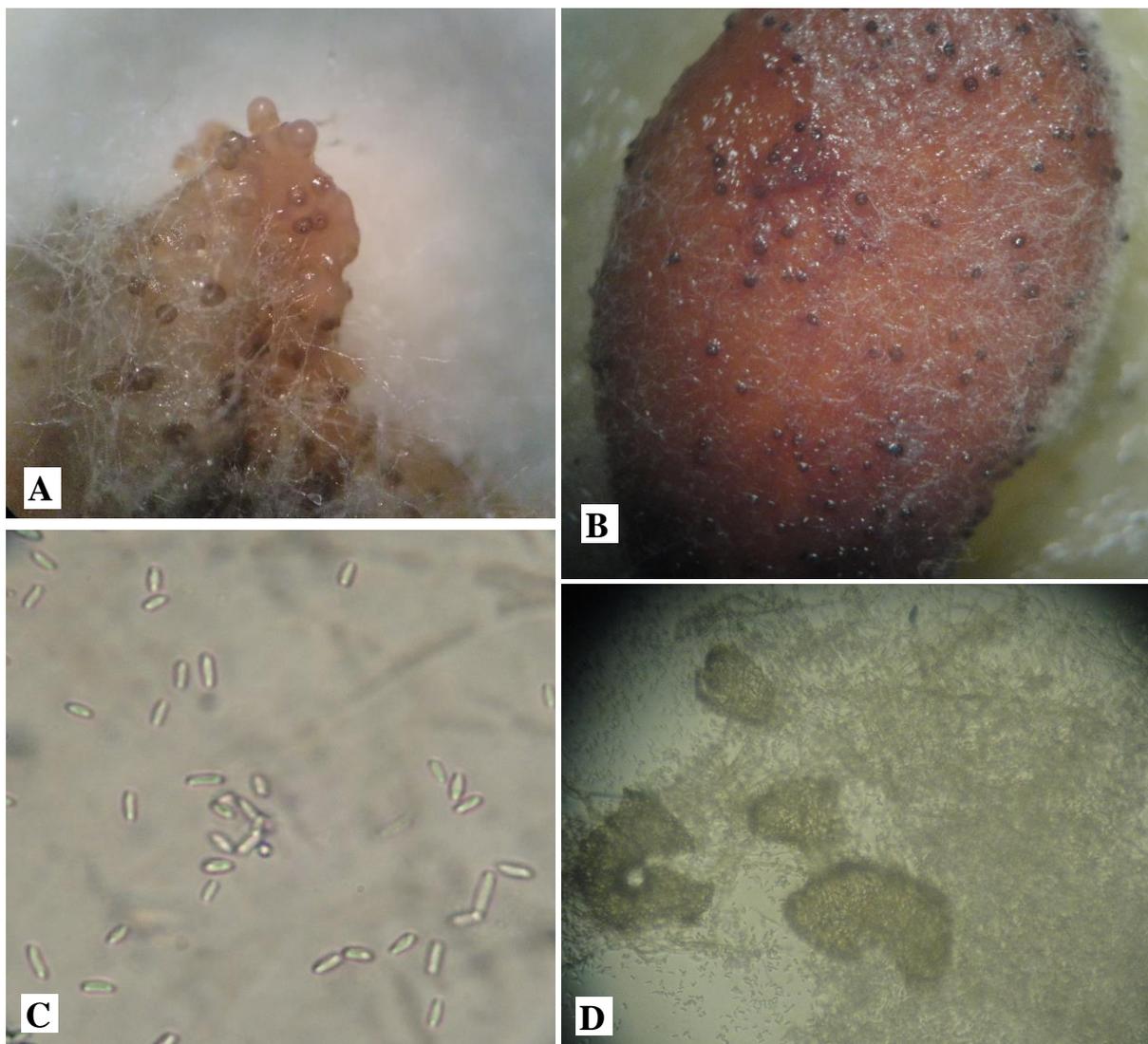


Figura 1.1 – Estruturas do fungo *Didymella bryoniae* formadas sobre sementes de melancia em teste de sanidade em meio de cultivo BDA. (a) Picnídios e micélio aéreo, aumento 20X; (b) Picnídios e micélio aéreo, aumento 10X; (c) Conídios, aumento 100X; (d) Picnídios rompidos, aumento 50X. Maringá-PR, 2017.

Nos testes de transmissão realizados em meio ágar-água e vermiculita expandida, foi possível quantificar a presença de *D. bryoniae* em todos os cultivares de melancia avaliados através da observação de sintomas nas plântulas e estruturas do patógeno nas sementes.

A porcentagem de detecção de *D. bryoniae* em meio ágar-água variou de 6% a 16% no primeiro ensaio e de 5% a 20% no segundo ensaio nos cultivares de melancia avaliados. Em meio contendo vermiculita expandida a detecção variou de 4% a 14% no primeiro ensaio e 3% a 19% no segundo ensaio. Não houve diferenças estatísticas entre os dois tipos de testes realizados em nenhum dos cultivares analisados. Ou seja, ambos os testes apresentaram o mesmo patamar de detecção quando comparados entre si.

Em testes para determinar a transmissão de *D. bryoniae* em melão rendilhado Gasparotto *et al.* (2009) observaram porcentagem de até 3% em ágar-água e até 14% em vermiculita expandida, enquanto Moura (2013), trabalhando com a cultura do pepino partenocárpico, observou porcentagem de transmissão de até 3,5% em ágar-água e até 1,5% em vermiculita expandida. Os autores comentam que a menor porcentagem observada de transmissão nos testes em relação aos testes, possivelmente ocorre devido ao menor estresse dessas plantas neste ambiente, pois existe evidência da relação entre o estresse sofrido pelas plantas e a expressão dos sintomas de crestamento-gomoso-do-caule (VIDA *et al.*, 2007).

Por outro lado, estes testes de transmissão parecem apresentar maior capacidade de detecção de *D. bryoniae* que os testes tradicionais com sementes (BDA, papel-filtro) pois além do microclima favorável ao patógeno e o ambiente estéril, há maior tempo para a expressão do patógeno, seja através dos sintomas nas plântulas ou formação de estruturas reprodutivas do fungo.

Os sintomas nas plântulas surgiram entre 3 a 10 dias após o início de germinação das sementes nos diferentes cultivares analisados. Também foram observadas sementes não germinadas na fase inicial de germinação as quais apresentaram hifas e picnídios de *D. bryoniae* aderidos ao perisperma e à região embrionária. Também se originaram lesões nos cotilédones nas regiões em contato com o perisperma da semente, indicando esta como uma possível fonte do inóculo. Diversos estudos demonstram que o fungo *D. bryoniae* pode estar associado ao perisperma, aos cotilédones ou mesmo ao embrião das sementes, sendo de difícil determinação a localização exata do inóculo, porém todos representam uma perigosa fonte de infecção (GASPAROTTO *et al.*, 2009; 2011; MOURA, 2013; SUDISHA *et al.*, 2006).

Em ambos os testes os sintomas foram visualizados com maior frequência nas raízes das plântulas, as quais apresentavam coloração amarelada e crescimento reduzido quando infectadas. Em ágar-água foi possível observar desenvolvimento radicular reduzido em plantas inicialmente assintomáticas as quais vieram posteriormente a demonstrar sintomas na parte aérea, o que pode sugerir que mesmo durante a fase assintomática na parte aérea, pode haver redução do desenvolvimento de raízes, o que é de difícil observação em condições de campo ou em outros substratos. Frequentemente lesões também foram observadas na região do hipocótilo, causando lesões aquosas que rapidamente levavam ao colapso do caule e necrose dos cotilédones. Sudisha *et al.* (2006) em testes similares com sementes de melão, também

relataram maior frequência de sintomas nos hipocótilos e presença de picnídios em sementes não germinadas (Figura 1.2).

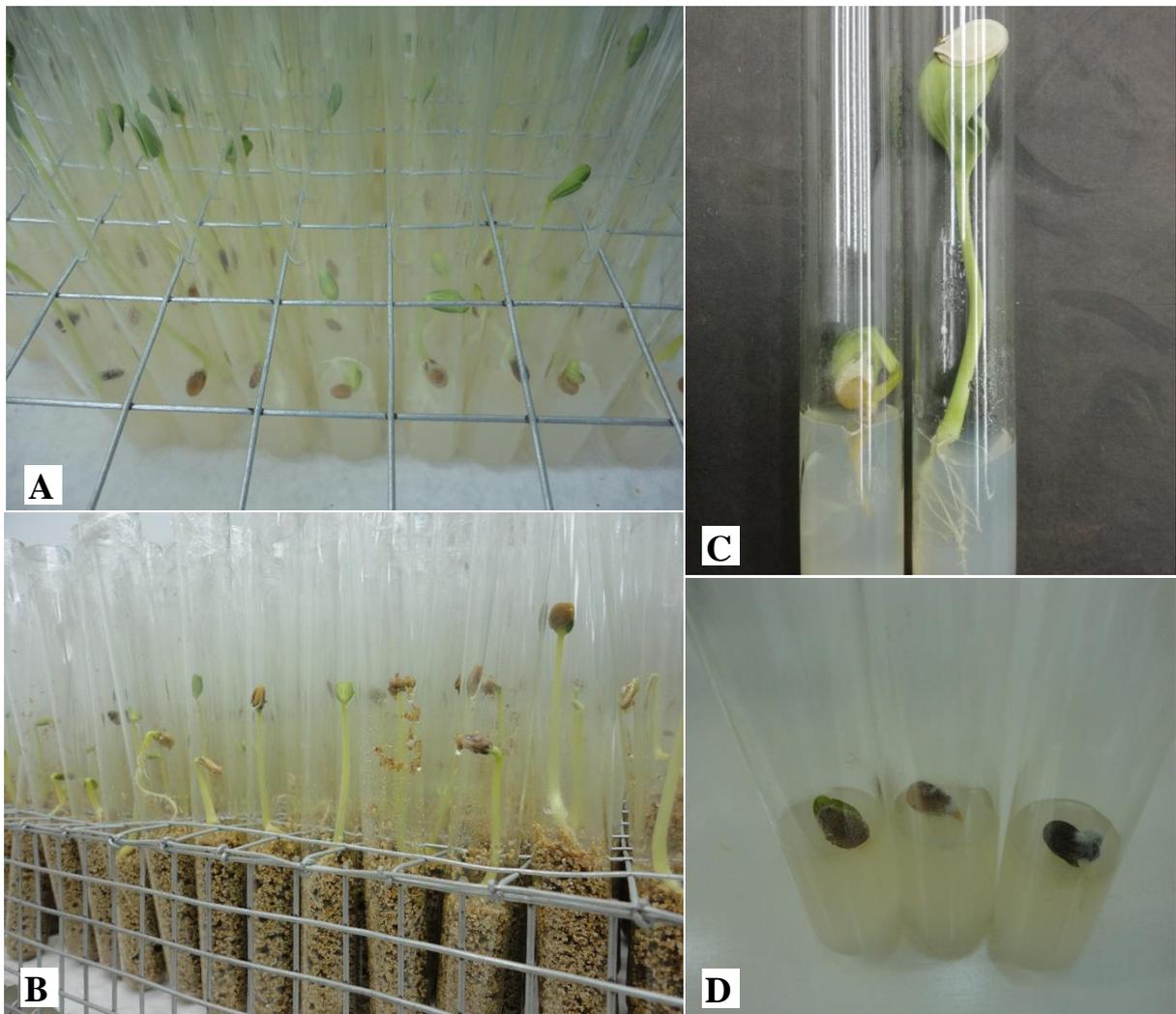


Figura 1.2 - Sintomatologia de crestamento-gomoso-do-caule (*Didymella bryoniae*) em plântulas de melancia: (a) Plantas assintomáticas em ágar-água; (b) plantas assintomáticas em vermiculita expandida; (c) Planta infectada à esquerda e planta assintomática à direita; (d) sementes em fase inicial de germinação apresentando sinais de *D. bryoniae*. Maringá-PR, 2017.

A característica de ausência de nutrientes nestes testes limita o desenvolvimento das plântulas às reservas fornecidas pelas sementes, dessa forma em sementes maiores que proporcionam plântulas mais vigorosas a observação dos sintomas do crestamento-gomoso-do-caule é facilitada. Apesar de ambos os testes apresentarem eficiência semelhantes, o meio ágar-água apresentou maior praticidade de montagem e facilidade de avaliação em relação à vermiculita expandida. Isso ocorreu em função da maior consistência do meio, coloração clara e transparência, o qual permite melhor contraste de cores e observação das raízes das plantas. O meio em vermiculita expandida permitiu melhor desenvolvimento das raízes das plântulas,

porém com visualização dificultada. O que torna necessária a retirada de plântula do ambiente estéril caso se necessite diagnóstico mais apurado da região do colo e raízes.

Nos testes de transmissão realizados em substrato comercial e em areia+solo esterilizados, foi possível a detecção do crestamento-gomoso-do-caule em todos os cultivares de melancia avaliados, através da observação de sintomas da doença nas mudas.

A porcentagem de transmissão de *D. bryoniae* em substrato comercial a base de casca de *pinus* esterilizada variou de 10,5 % a 37,0 % no primeiro ensaio e de 11,5 % a 55,0 % no segundo ensaio nos cultivares de melancia avaliados. Em substrato areia+solo esterilizado a transmissão variou de 4% a 30,5% no primeiro ensaio e 1% a 50% no segundo ensaio dentre os cultivares de melancia analisados. Não houve diferenças estatísticas entre os dois tipos de testes realizados em nenhum dos cultivares analisados. Ou seja, ambos os testes apresentaram o mesmo patamar de detecção quando comparados entre si. Porém, para alguns cultivares a porcentagem de detecção nestes testes foi estatisticamente superior aos demais testes avaliados, sobretudo para substrato comercial, o qual apresentou a maior média de detecção de *D. bryoniae* nos seis cultivares analisados.

De forma geral, foi observada menor porcentagem de transmissão de *D. bryoniae* nos testes realizados em ambiente estéril, em relação aos realizados em casa de vegetação, mostrando menor sensibilidade desses para a determinação da infecção das sementes por *D. bryoniae*. Fato que corrobora com os resultados encontrados por Gasparotto (2010) para sementes de melão e reforça a tese que o patógeno pode permanecer na forma latente (GASPAROTTO *et al.*, 2011), sem demonstrar sintomas da doença, enquanto as plantas não sofrem estresse (VIDA *et al.*, 2007).

Todos os cultivares analisados apresentaram menor transmissão em areia+solo em relação ao substrato comercial, fato que pode ser reflexo da menor capacidade de desenvolvimento das plantas em areia, que reduz a expressão dos sintomas de crestamento-gomoso-do-caule em função da restrição do crescimento. Em testes similares com lotes de sementes de meloeiro nobre, Gasparotto *et al.* (2009) não observaram sintomas de crestamento-gomoso-do-caule após 60 dias de avaliações em areia+solo. Porém, após submeter as plântulas à câmara úmida foi constatada a formação de picnídios de *D. bryoniae*, indicando resultados de transmissão subestimados em areia+solo. No entanto, em substrato comercial observaram transmissão de *D. bryoniae* variando de 28,0% a 52,0% no mesmo período avaliado. Moura

(2013) observou porcentagem de transmissão de *D. bryoniae* de 7,0% em substrato comercial e 11,5% em areia utilizando sementes de pepino partenocárpico importadas.

O surgimento dos primeiros sintomas de crestamento-gomoso-do-caule nos lotes avaliados em substrato comercial e areia+solo ocorreram entre 3 a 25 dias após a emergência. O cultivar ‘Landrace’, o qual se esperava menor sanidade das sementes devido à propagação sem cuidados sanitários ao longo das gerações, apresentou menor período de latência com início dos sintomas aos 3 dias após a emergência. O cultivar ‘Smile’ apresentou início dos sintomas aos 25 dias após a emergência. Em ensaios similares, Gasparotto *et al.* (2009) e Moura (2013) relataram início de sintomas aos 32 em melão rendilhado e 30 dias em pepino partenocárpico, respectivamente.

Os sintomas iniciaram-se nos cotilédones a partir do centro ou das bordas na forma inicial de lesões aquosas com a exsudação ou não de seiva, os quais evoluíram na forma de manchas necróticas com bordas encharcadas até a senescência total do cotilédone. Após a senescência do cotilédone ou mesmo antes, as lesões atingiram o caule na região de inserção cotiledonar levando ao colapso do caule e morte da gema apical da plântula. Os sintomas também se iniciaram no hipocótilo na forma de lesões ovaladas deprimidas com aspecto encharcado, que evoluíram na forma de fendilhamento externo do caule, acompanhado ou não de imediato colapso e morte da planta (Figura 1.3).

Os testes em substrato comercial e areia+solo, apesar de serem iniciados com equipamentos e materiais esterilizados, ficam expostos ao ambiente da casa de vegetação durante a condução dos testes. Desta forma, não há um impedimento que ocorra contaminação com inóculo externo ou infecção secundária entre plantas durante seu desenvolvimento e avaliações. Porém tais fatos podem e devem ser minimizados com cuidados no manuseio e remoção imediata das plantas com diagnóstico positivo da casa de vegetação. Mesmo com estas possíveis interferências, há grande relevância destes testes para a avaliação de danos provocados por *D. bryoniae* em mudas de cucurbitáceas, pois ao possibilitar maior desenvolvimento das mudas e maior tempo de avaliação, permite melhor avaliação do potencial de dano do crestamento-gomoso-do-caule nos cultivares em condições de viveiro e campo.



Figura 1.3 – Sintomatologia de crestamento-gomoso-do-caule (*Didymella bryoniae*) em plântulas de melancia: (a) Sintomas na folha cotiledonar; (b) Folha cotiledonar necrosada com presença de picnídios; (c) Evolução do sintoma a partir da folha cotiledonar até o hipocótilo; (d) Lesões deprimidas no hipocótilo. Maringá-PR, 2017.

Os resultados deste trabalho mostram que *D. bryoniae* está associada a sementes comerciais de melancia de diferentes origens e qualidades sanitárias. Este fato ressalta a importância de serem tomadas medidas sanitárias visando a detecção e mitigação da dispersão do patógeno mesmo em lotes comerciais de alto padrão, pois mesmo pequenas porcentagens de infecção das sementes podem servir como inóculo inicial para grandes epidemias em condições de viveiro ou campo, quando as condições forem favoráveis à manifestação da doença.

Neste ponto a análise sanitária das sementes exige atenção quanto ao teste utilizado e sua capacidade de detecção do patógeno. Enquanto a técnica da detecção molecular não

apresentar capacidade de detecção e quantificação dos múltiplos patógenos que podem afetar as sementes agrícolas a um custo econômico, os testes tradicionais de detecção continuarão sendo ferramentas importantes no diagnóstico e quantificação da doença. Após a análise sobre a capacidade de detecção de cada tipo de metodologia, a escolha de qual utilizar deve considerar o objetivo final da pesquisa, como o nível de detalhamento das informações exigidas e a adaptação do teste à rotina e à infraestrutura do laboratório.

Os resultados deste trabalho indicam que os testes em substrato, areia+solo, ágar-água e vermiculita apresentaram maior capacidade de detecção de *D. bryoniae*, principalmente através da avaliação da expressão dos sintomas causados pelo fungo nas plântulas. Os testes de sanidade em papel filtro e meio BDA não foram eficientes na detecção do patógeno.

CONCLUSÕES

Com bases nos resultados obtidos neste trabalho concluiu-se que:

Os testes de sanidade de sementes realizados em papel-filtro e meio BDA, com sementes inteiras e divididas, apresentaram resultados falsos-negativos ou baixa capacidade de detecção de *D. bryoniae* nos cultivares de melancia avaliados, não sendo recomendado seu uso na avaliação de lotes de sementes de melancia.

Os testes de transmissão em meio ágar-água e vermiculita expandida, realizados em ambiente estéril, apresentaram capacidade de detecção de *D. bryoniae* nos lotes de melancia avaliados e podem ser utilizados na avaliação de lotes de sementes de melancia.

Os testes de transmissão em substrato comercial e areia+solo, realizados em casa de vegetação, apresentaram capacidade de detecção de *D. bryoniae* nos lotes de melancia avaliados e podem ser utilizados na avaliação de lotes de sementes de melancia.

1.6 REFERÊNCIAS

BRASIL. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. 1. ed. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009.

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. 1. ed. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009b.

CHOI, I. Y. et al. Identification and characterization of the causal organism of gummy stem blight in the muskmelon (*Cucumis melo* L.). **Mycobiology**, v. 38, n. August 2009, p. 166, 2010.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2 ed. rev. Viçosa: UFV, 2008.

GASPAROTTO, F. *et al.* 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.

GASPAROTTO, F. **Transmissão e controle de *Didymella bryoniae* em meloeiro nobre**. 2010. 169f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Programa de pós-graduação em Agronomia. Universidade Estadual de Maringá, 2010.

GASPAROTTO, F. *et al.* Infecção latente de *Didymella bryoniae* em meloeiro nobre. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 62–64, 2011.

IBGE. **IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e estatística**. Disponível em: <<http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/default.aspx>>. Acesso em: 3 jun. 2016.

KEINATH, A. P. Survival of *Didymella bryoniae* in Infested Muskmelon Crowns in South Carolina. **Plant Disease**, v. 86, n. 9, p. 32–38, 2002.

KEINATH, A. P. From native plants in central Europe to cultivated crops worldwide: The emergence of *Didymella bryoniae* as a cucurbit pathogen. **HortScience**, v. 46, n. 4, p. 532–535, 2011.

KEINATH, A. P. Diagnostic guide for gummy stem blight and black rot on cucurbits. **Plant Health Progress**, n. August, 2013a.

KEINATH, A. P. Susceptibility of cucurbit rootstocks to *Didymella bryoniae* and control of gummy stem blight on grafted watermelon seedlings with fungicides. **Plant Disease**, v. 97, n. 8, p. 1018–1024, ago. 2013b.

KEINATH, A. P. Differential susceptibility of nine cucurbit species to the foliar blight and crown canker phases of gummy stem blight. **Plant Disease**, v. 98, n. 2, p. 247–254, fev. 2014.

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.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A.; REZENDE, J. A. M. Doenças das cucurbitáceas. In: KIMATI, H. *et al.* (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Doença das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 293–310.

LEE, D.-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. **Journal of Phytopathology**, v. 109, n. 4, p. 301–308, abr. 1984.

LUCCA FILHO, O. A. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: MENTEN, J. O. (Ed.). **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. Piracicaba: Esalq, 1991. p. 276–298.

MOURA, G. S. **Transmissão, detecção e controle de *Didymella bryoniae* em pepino e infecção em melão**. 2013. 134f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Programa de pós-graduação em Agronomia. Universidade Estadual de Maringá, 2013.

MUNKVOLD, G. P. Seed pathology progress in academia and industry. **Annual review of phytopathology**, v. 47, p. 285–311, 2009.

NEERGARD, P. **Seed pathology**, vols I and II. New York, USA: John Wiley & Sons, 1977.

NGUGI, H. K.; SCHERM, H. Biology of flower-infecting fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, n. 1, p. 261–282, set. 2006.

PÉREZ, J. *et al.* Sintomatología e identificación del agente causal del tizón gomoso del tallo en sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum y Nakai) en la isla de la Juventud. **Protección Vegetal**, v. 27, n. 1, p. 13–18, 2012.

REHM, H. *Didymella bryoniae* (Awd.) Rehm. Ber. **Naturhist. Ver. Augsburg**, p. 26:27, 1881.

SANTOS, G. R.; CAFÉ-FILHO, A. C.; SABOYA, L. M. F. Controle químico do cretamento gomoso do caule em melancia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 155–163, 2005.

SILVA, F.; AZEVEDO, C. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **Afr. J. Agric. Res.**, v. 11, n. 39, p. 3733–3740, 2016.

SUDISHA, J. *et al.* 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.

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, n. (S), p. 324, 1993.

VIDA, J. B.; FERNANDES, J.; OLIVEIRA, R. R. Doenças em cultivo protegido: situação atual e perspectivas. In: ZAMBOLIM, L. *et al.* (Eds.). **Doenças em cultivo protegido: situação atual e perspectivas**. Viçosa: Universo, 2007. p. 91–114.

CAPÍTULO II

Infecção latente e sistêmica de *Didymella bryoniae* em melancia

2.1 RESUMO

Infecção latente e sistêmica de *Didymella bryoniae* em melancia. *Didymella bryoniae* é um importante patógeno na cultura da melancia e outras cucurbitáceas, podendo causar crestamento-gomoso-do-caule, tombamento de plântulas, manchas foliares e podridão em frutos. *D. bryoniae* é transmitido via sementes infectadas e há indícios de ocorrência de infecção latente e sistêmica na cultura da melancia, mecanismo já comprovado para outras cucurbitáceas. O objetivo deste trabalho foi o de verificar a ocorrência de infecção latente e sistêmica de *D. bryoniae* em plantas de diferentes cultivares de melancia, através de PCR multiplex utilizando oligonucleotídeos específicos para o patógeno, anteriormente desenvolvidos. Foram realizadas análises de PCR multiplex a partir do DNA extraído de plântulas de melancia assintomáticas de 7, 21 e 40 dias de idade. Adicionalmente foram realizadas análises de PCR multiplex em segmentos de caules localizados a 0 cm, 5 cm, 15 cm, 30 cm e 60 cm acima do tecido lesionado. Foi comprovada a existência de infecção latente do patógeno nas mudas assintomáticas em todos os cultivares analisados. Foi possível constatar infecção sistêmica em plantas adultas através da detecção do patógeno em segmentos de caule localizado até 60 cm acima do tecido lesionado.

Palavras-chave: *Citrullus lanatus*, Crestamento-gomoso-do-caule, detecção molecular, patologia de sementes.

2.2 ABSTRACT

Latent and systemic infection of *Didymella bryoniae* in watermelon. *Didymella bryoniae* is an important pathogen in watermelon and other Cucurbitaceae, which can cause gummy-stem-blight, dumping-off, leaf spots and fruit rot. Transmission of *D. bryoniae* occurs through infected seeds and there is evidence of latent and systemic infection in watermelon crop, a verified mechanism for other Cucurbitaceae. The objective of this work was to verify the latent and systemic infection existence of *D. bryoniae* in different watermelon cultivars, through multiplex PCR using previously developed pathogen-specific oligonucleotides. Multiplex PCR analyzes were performed from DNA extracted from asymptomatic watermelon seedlings at 7, 21 and 40 days of age. In addition, multiplex PCR analyzes were performed on stem segments located at 0 cm, 5 cm, 15 cm, 30 cm and 60 cm above the injured tissue. The results confirmed the latent infection of the pathogen in asymptomatic seedlings in all cultivars analyzed. It was possible to identify systemic infection in adult plants by detecting the pathogen in stem segments located up to 60 cm above the injured tissue

Keywords: *Citrullus lanatus*, Gummy-stem-blight, molecular detection, seed pathology.

2.3 INTRODUÇÃO

Didymella bryoniae (Auersw.) (REHM, 1881) (sinon. *Mycosphaerella citrullina* (C.O. Sm.) Grossenb. – *Mycosphaerella melonis* (Pass.) W.F. Chiu & J.C. Walker), anamorfo *Ascochyta cucumis* (Fautrey; Roum [= *Phoma cucurbitacearum* (Fr.: Fr.) Sacc.]) é um fungo parasita necrotrófico facultativo de plantas da família *Cucurbitaceae*. *D. bryoniae* provoca tombamento de plântulas, manchas foliares, podridão negra em frutos e crestamento-gomoso-do-caule em plantas da família *Cucurbitaceae*, na qual é hospedeiro-específico (KEINATH, 2011).

D. bryoniae pode estar presente sobre ou mesmo dentro das sementes de *Cucurbitaceae* em função da fase de desenvolvimento na qual ocorreu a infecção. Esta é uma das formas potencialmente mais perigosas e silenciosas de dispersão do patógeno, servindo como fonte de inóculo inicial para a dispersão da doença e introdução em novas áreas (KEINATH, 2002;2013b; SUDISHA *et al.*, 2006). A infecção das sementes pode reduzir a germinação e vigor, comprometendo a produtividade pela transmissão do patógeno das sementes para as plantas (SUDISHA *et al.*, 2006). O inóculo presente nas sementes representa uma das principais formas de introdução da doença em áreas livres, englobando distâncias continentais. Certamente esse mecanismo direto de infecção das sementes para mudas, contribuiu para o aumento da importância de *D. bryoniae* como patógeno a nível mundial.

Steekelenburg (1986) demonstrou que frutos de pepino se tornaram infectados após inoculação das flores com *D. bryoniae*, porém os frutos afetados, apesar da infecção, não apresentaram sintomas externos. Segundo Gasparotto (2010) plantas de melão que tiveram suas flores expostas a inóculo de *D. bryoniae*, produziram frutos assintomáticos os quais produziram sementes viáveis e infectadas. Essas características sugerem que a infecção de cucurbitáceas por *D. bryoniae* pode ser latente, ou seja, a planta infectada permanece assintomática até que algum estresse desencadeie o início dos sintomas (VIDA *et al.*, 2007). A primeira referência ao fato foi relatada em meloeiro nobre por Vida *et al.* (2002) que observaram início de sintomas apenas 35 dias após o transplante das mudas. Esse mecanismo de infecção latente já foi demonstrado posteriormente em plantas de melão rendilhado (GASPAROTTO *et al.*, 2011) e pepino partenocárpico (MOURA, 2013).

Em ambientes climáticos favoráveis o patógeno pode provocar sintomas em todas as partes de cucurbitáceas, incluindo folhas, pecíolos, pedicelos, flores, pedúnculos, frutos e sementes (KEINATH, 2013a). O que evidencia que o patógeno também pode causar infecção sistêmica na planta, a partir do inóculo da semente. Por sua vez, a infecção latente dificulta a diagnose precoce da presença de *D. bryoniae* em mudas em fase de viveiro, o que pode favorecer a dispersão de *D. bryoniae* e introdução em novas áreas devido à adoção de medidas de controle tardias, quando a doença já está estabelecida. As implicações epidemiológicas dessas características são a alta eficiência de dispersão, transmissão e danos, que podem chegar a até 60% na cultura da melancia (SANTOS e CAFÉ FILHO, 2005).

O uso de técnicas moleculares pode favorecer a diagnose precoce da doença. Vários trabalhos sugerem a utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) como forma segura de detecção precoce de infecções mediante o uso de nucleotídeos específicos do alvo a ser detectado e a correta adequação de protocolo de extração e purificação de DNA. Foi desenvolvido um conjunto de oligonucleotídeos específicos para a detecção de *D. bryoniae* através de técnica de PCR multiplex (KOCH e UTKHEDE, 2004) que pode servir de ferramenta para detecção precoce em vários hospedeiros.

Assim o objetivo deste trabalho foi o de verificar a ocorrência de infecção latente e sistêmica de *D. bryoniae* em plantas de diferentes cultivares de melancia, através de PCR multiplex utilizando oligonucleotídeos específicos para o patógeno.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 Infecção latente em plantas de melancia

Foram utilizados cinco lotes comerciais de sementes de melancia adquiridas em casas comerciais da cidade de Maringá-PR dos cultivares ‘Smile’, ‘PX2007’, ‘Crimpia’, ‘Fairfax’, ‘Crimson Select’; e um lote de sementes de melancia obtido de pequeno produtor que multiplicava suas próprias sementes há várias gerações, a qual foi nomeada como ‘Landrace’.

Foram semeadas 200 sementes de melancia de cada um dos cultivares, em bandejas plásticas de 100 células (16 cm² de abertura superior e 10 cm de profundidade cada célula) contendo substrato à base de casca de pinus da marca Plant Max HF. O substrato foi autoclavado a 120 °C durante duas horas, o processo foi repetido após 24 horas. A semeadura ocorreu após 48h, dispendo-se as sementes na posição horizontal a 1 cm de profundidade no substrato. Foram utilizadas duas bandejas para cada cultivar. As sementes foram previamente lavadas em água destilada para remoção de resíduos aderidos à casca e tratamentos químicos.

As bandejas foram mantidas em casa de vegetação semi-climatizada localizada nas dependências do campus sede da Universidade Estadual de Maringá, no período de abril a junho de 2015. Foi realizada irrigação automática com água de torneira ajustada de acordo com a necessidade da cultura. Após a emergência, as plantas foram observadas diariamente quanto à presença de sintomas de crestamento-gomoso-do-caule e as plantas sintomáticas foram imediatamente descartadas, afim de evitar contaminação secundária das plantas adjacentes.

Foram realizadas três coletas aos 7, 21 e 40 dias após a emergência das plantas nas bandejas, a qual ocorreu dia 05/05/2015. A cada coleta 5 plantas assintomáticas de cada cultivar, que se apresentavam visualmente sadias sem quaisquer sintomas ou sinais de infecção por doenças, foram cortadas com tesoura na região do colo. No intervalo entre cada corte, o instrumento foi lavado em água destilada e esterilizado com álcool 70%. Na sequência as plantas foram lavadas externamente com água destilada afim de remover quaisquer resíduos ou esporos aderidos externamente a estas. As plantas foram acondicionadas individualmente em sacos plásticos hermeticamente fechados e imediatamente congeladas a -20 °C até o momento da extração do DNA.

2.4.2 Infecção sistêmica em plantas de melancia

Com o objetivo de verificar a ocorrência de infecção sistêmica de *D. bryoniae* em plantas de melancia, foi realizada a condução de população de 50 plantas em ambiente protegido tipo estufa plástica, modelo túnel alto, teto coberto com plástico de polietileno de baixa densidade, 150 micras e as laterais revestidas com tela anti-afídica (dimensões de 30 m de comprimento, 7 m de largura e pé-direito de 2,5 m).

Foram utilizadas sementes comerciais de mini melancia híbrida 'Smile' (Takii seeds). As mudas foram produzidas em bandejas de EPS (poliestireno expandido), contendo substrato a base de casca de *Pinus* carbonizada e vermiculita. As mudas foram transplantadas para a estufa plástica aos 28 dias após a emergência, quando apresentavam a segunda folha definitiva em desenvolvimento inicial. Foi utilizado espaçamento de 0,5 m entre plantas e 1,0 m entre linhas de plantio.

As plantas foram conduzidas no sistema semi-hidropônico, utilizando-se vasos plásticos contendo 12 L de areia lavada. O fornecimento de nutrientes foi realizado via gotejamento, utilizando solução nutritiva contendo, para cada volume de 1000 L de água, 1.053 g de nitrato de cálcio, 500 g de sulfato de magnésio hepta-hidratado, 217 g de fosfato monopotássico, 700 g de sulfato de potássio e 30 g de concentrado de micronutrientes contendo Fe-EDTA 7,26%; Cu-EDTA, 1,82%; Zn-EDTA 0,73%; Mn-EDTA 1,82%; B 1,82%; Mo 0,36% e Ni 0,335%.

Foram utilizadas para inoculação das plantas colônias de *D. bryoniae* originadas de isolados de plantas de melancia coletados previamente. As colônias estavam com 10 dias de crescimento micelial e foram mantidas em regime de 12 h de luz e 12 h de escuro cultivadas em placas de Petri contendo substrato BDA com ¼ de concentração. A inoculação das plantas foi realizada através do método do palito modificado (VERZIGNASSI *et al.*, 2004). Para tal, discos de meio de cultivo BDA contendo micélio de *D. bryoniae* foram retirados das bordas de colônias e transferidos para a superfície do caule das plantas previamente feridos por estilete. O disco foi fixado na porção do terceiro entrenó as plantas com fita adesiva e coberto com filme de PVC durante 48h. Após esse período, o filme de PVC e o disco de micélio foram removidos. A inoculação foi realizada aos 20 dias após o transplântio nas 50 plantas.

Aos 60 dias após o transplântio foram selecionadas quatro plantas que apresentavam sintomas de crestamento-gomoso-do-caule. O caule dessas plantas foi inicialmente coletado inteiro e levado para laboratório, onde o mesmo foi lavado e desinfestado com água destilada. O caule foi segmentado com o uso de bisturi, o qual era esterilizado em chama entre cada corte.

Foram coletados segmentos de caule com comprimento de 5 cm localizados no tecido lesionado e acima deste 5 cm, 15 cm, 30 cm e 60 cm.

Os segmentos de caule foram acondicionados individualmente em sacos plásticos hermeticamente fechados e imediatamente congelados a -20 °C até o momento da extração do DNA.

2.4.3 Extração de DNA total

A extração de DNA em ambos experimentos seguiu a metodologia recomendada por Murray e Thompson (1980) com modificações. O tecido fibroso das amostras foi macerado em almofariz de porcelana na presença de nitrogênio líquido até a obtenção de consistência de pó fino. Cerca de 270 mg do material macerado foi transferido para microtubo com capacidade de 1,5 mL. A cada microtubo foi adicionado 800 µL de solução de extração [0,7 M de NaCl, 1% CTAB, 50 mM Tris-HCL (pH 8,0), 10 mM EDTA e 1% de mercaptoetanol] e homogeneizado em vortex. As amostras foram incubadas em banho-maria a 60 °C por 30 min, agitando-se a cada 10 min. Após resfriamento à temperatura ambiente, às amostras foi adicionado 800 µL de clorofórmio e álcool isolamílico na proporção de 24:1. Os tubos foram então agitados levemente cerca de 100 vezes e na sequência centrifugados a 8000 rpm durante 10 min. Cerca de 600 µL do sobrenadante foi transferido para novo microtubo devidamente identificado. Ao mesmo foi adicionado 60 µL de CTAB 10% e agitado duas vezes com a ponteira da pipeta. O processo de adição de clorofórmio e álcool isolamílico seguido da centrifugação foi repetido duas vezes. Cerca de 400 µL do sobrenadante foi transferido para novo microtubo devidamente identificado e mantido em repouso por 60 min. Após esse período foi realizada nova centrifugação a 11000 rpm durante 10 min, o sobrenadante foi descartado. O sedimento obtido foi dissolvido em 400 µL de tampão TE alto sal [Tris HCL (pH 7,5) 1 M, EDTA 0,5M (pH 8,0), NaCl 5M) em banho maria a 65 °C até a total dissolução. Na sequência o DNA foi precipitado com a adição de 800 µL de etanol absoluto gelado seguido de centrifugação a 12000 rpm por 5 min. Após a remoção do sobrenadante o processo foi repetido mais uma vez. Os microtubos contendo o DNA foram mantidos abertos e inclinados até a evaporação do etanol e secagem do precipitado. O DNA foi ressuspendido em 25 µL de TE 1/10 + RNase e mantido por 1 h a 37 °C. Ao final as amostras foram mantidas a -20 °C.

2.4.4 Reação de PCR multiplex

As amostras com o DNA total extraído foram submetidas à reação em cadeia da polimerase, em reações múltiplas simultâneas (PCR Multiplex). Como controle negativo foi utilizado mix de reação sem a adição de DNA.

Foram utilizados os oligonucleotídeos específicos para detecção de *D. bryoniae* denominados D7S (5'-CTACAATTGCGGGCTTTGC), D6 (5'-CGCCGATTGGACAAAACCTTAAA) e UNLO28S22 (5'-GTTTCTTTTCTCCGCTTATTGATATG), em reação múltipla. Na presença de DNA de *D. bryoniae* estes oligonucleotídeos formam amplicons de 535 pares de bases (UNLO28S22 + D7S) e 461 pares de bases (UNLO28S22 + D6) (KOCH e UTKHEDE, 2004). Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA).

As análises foram realizadas no laboratório do Núcleo de Biotecnologia Aplicada (NBA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), utilizando termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient. Foram utilizados microtubos de 200 µL contendo 5 µL do DNA total extraído, 11,85 µL de água milieq, 2,5 µL de tampão 10X, 1,25 µL de MgCl₂, 0,25 µL de cada DNTP, 1 µL de cada um dos primers (15 pmol) e 0,4 µL da enzima Taq polimerase Platinum (5 u/µL). A reação de PCR foi realizada em 31 ciclos com temperaturas de 94 °C por 45 segundos, 63 °C por 45 segundos e 72 °C por 45 segundos. Antes do início do primeiro ciclo as amostras foram submetidas a 94 °C durante 3 minutos para ativação da enzima Taq polimerase e ao final um período extra de extensão de 10 minutos a 72 °C.

Os amplicons de DNA foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídio (0,5 µg.mL⁻¹) e submerso em tampão TBE. A eletroforese foi realizada a 100 V durante 30 min. Ao final do processo o gel foi visualizado e fotografado sob luz ultravioleta.

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da técnica molecular de PCR multiplex foi possível observar a ocorrência de infecção latente de *D. bryoniae* nas plantas de melancia avaliadas aos 7, 21 e 40 dias após a emergência, havendo a amplificação de fragmentos genômicos de aproximadamente 535 pb (UNLO28S22 + D7S) e 461 pb (UNLO28S22 + D6). Os resultados de infecção latente em plântulas assintomáticas de melancia são apresentados na Tabela 2.1.

Aos 7 dias ocorreu detecção positiva apenas nos cultivares ‘Crimson Select’ e ‘Landrace’. Com destaque para ‘Landrace’ que apresentou maior proporção de amostras positivas (4/5), refletindo a menor qualidade sanitária das sementes não-comerciais desse cultivar.

Aos 21 e 40 dias, ocorreu detecção positiva nas mudas de todos os cultivares analisados. Com total de amostras positivas somando 19 de 30 amostras (63,3%) aos 21 dias e em 24 de 30 amostras (80%) aos 40 dias. Enquanto aos 7 dias apenas 5 em 30 amostras foram positivas (16,7%).

Tabela 2.1 – Infecção latente de *Didymella bryoniae* em plântulas assintomáticas de melancia de diferentes cultivares através de PCR multiplex. Maringá-PR, 2017.

Cultivar	Dias após emergência (DAE)		
	7	21	40
Smile	0/5*	3/5	3/5
PX2007	0/5	4/5	4/5
Crimpia	0/5	4/5	4/5
Fairfax	0/5	3/5	4/5
Crimson Select	1/5	2/5	5/5
Landrace	4/5	3/5	4/5
Total	6/30	19/30	24/30

*Número de amostras positivas / total de amostras analisadas.

A menor porcentagem de detecção encontrada aos 7 dias pode ocorrer em função do tamanho reduzido das plantas nessa idade, o que pode limitar a detecção pela limitação da

amostra analisada, quando se considera a análise de plantas individuais. Assim as amostras coletadas aos 21 e 40 dias após a emergência das plantas parecem mostrar resultados mais consistentes, seja pela maior quantidade de amostra e possivelmente aumento do DNA fúngico presente nas plantas.

Em trabalho similar com mudas de pepino partenocárpico conduzidas em substrato a base de casca de *Pinus*, Moura (2013) detectou a ocorrência do mesmo fenômeno, com detecção positiva de *D. bryoniae* em 37,5% das amostras realizadas até os 32 dias após a emergência. Com o uso de fungicidas no tratamento das sementes a porcentagem de detecção se reduziu, porém, ainda foram observadas 15,6% de amostras positivas. Gasparotto *et al.* (2011) também relataram a observação de infecção latente de *D. bryoniae* em três híbridos de meloeiro nobre, com coleta e análise de plantas assintomáticas com 40 dias após emergência.

A infecção assintomática de *D. bryoniae* em melancia pode favorecer a dispersão do patógeno, pois reduz a detecção precoce da doença ainda em condições de viveiro e o descarte das plantas infectadas. As plantas com infecção latente geralmente passam a expressar a doença logo após o transplante para campo, devido ao estresse da mudança de ambiente (VIDA *et al.*, 2007).

Os resultados de infecção sistêmica de *D. bryoniae* em plantas de melancia são apresentados na Tabela 2.2. As plantas selecionadas na população para a realização das análises apresentavam lesões de crestamento-gomoso-do-caule apenas na região de inoculação do fungo, localizado no terceiro entrenó da haste principal. Com lesões em torno de 5 cm de comprimento no momento da coleta.

Os resultados das análises mostram que a primeira seção do caule localizado no tecido sintomático, apresentou resultados positivos em todas as amostras avaliadas, confirmando que a inoculação de *D. bryoniae* foi bem-sucedida. Na seção localizada 5 cm acima do término da área lesionada no caule, houve a detecção do DNA fúngico em três de quatro amostras analisadas. Na posição 15 cm acima foram positivas duas de quatro amostras; a 30 cm duas de quatro amostras e a 60 cm três de quatro amostras foram positivas.

Tabela 2.2 - Infecção sistêmica de *Didymella bryoniae* em segmentos de caules de plantas adultas coletados a 0, 5 cm, 15 cm, 30 cm e 60 cm acima da área lesionada. Maringá-PR, 2017.

Posição	Amostras positivas*				Total Positivas
	Planta 1	Planta 2	Planta 3	Planta 4	
0 cm	+ ¹	+	+	+	4
5 cm	+	+	-	+	3
15 cm	+	-	-	+	2
30 cm	-	+	+	-	2
60 cm	+	-	+	+	3

*Amostra composta por porção interna de segmento de caule de 5 cm de comprimento. ¹Os sinais ‘+’ e ‘-’ representam amostras com resultado positivo e negativo, respectivamente, para presença de *D. bryoniae* no segmento avaliado.

A infecção sistêmica é entendida como a redistribuição do patógeno internamente no hospedeiro, não se restringindo à área primária de infecção. Podendo haver a presença do microrganismo e expressão de sintomas em partes mais distantes da área inicialmente afetada (AGRIOS, 2005). Os resultados confirmam a hipótese de que há infecção sistêmica de *D. bryoniae* em caules de melancia, pois foi constatada a presença de DNA fúngico nas secções superiores do caule, mesmo sem manifestação externa de sintomas. A infecção sistêmica por *D. bryoniae* já havia sido relatada em outras cucurbitáceas como o meloeiro nobre (GASP

2.6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados da análise molecular através de PCR multiplex foi possível confirmar a hipótese de ocorrência de infecção latente de *D. bryoniae* em plantas assintomáticas de melancia.

Com base na análise molecular através de PCR multiplex de secções assintomáticas do caule, distantes entre 5 e 60 cm do tecido lesionado, foi possível confirmar a hipótese de ocorrência de infecção sistêmica de *D. bryoniae* em plantas de melancia.

2.7 REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N.; **Plant Pathology**. 5th Edition. Elsevier Academic Press, 2005.
- GASPAROTTO, F. **Transmissão e controle de *Didymella bryoniae* em meloeiro nobre**. 2010. 169f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Programa de pós-graduação em Agronomia. Universidade Estadual de Maringá, 2010.
- GASPAROTTO, F. *et al.* Infecção latente de *Didymella bryoniae* em meloeiro nobre. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 62–64, 2011.
- KEINATH, A. P. Diagnostic guide for gummy stem blight and black rot on cucurbits. **Plant Health Progress**, n. August, 2013a.
- KEINATH, A. P. Susceptibility of cucurbit rootstocks to *Didymella bryoniae* and control of gummy stem blight on grafted watermelon seedlings with fungicides. **Plant Disease**, v. 97, n. 8, p. 1018–1024, ago. 2013b.
- KEINATH, A. P. From native plants in central Europe to cultivated crops worldwide: The emergence of *Didymella bryoniae* as a cucurbit pathogen. **HortScience**, v. 46, n. 4, p. 532–535, 2011.
- KEINATH, A. P. Survival of *Didymella bryoniae* in infested muskmelon crowns in south carolina. **Plant Disease**, v. 86, n. 9, p. 32–38, 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 of Plant Pathology**, v. 26, n. 3, p. 291–298, 2004.
- MOURA, G. S. **Transmissão, detecção e controle de *Didymella bryoniae* em pepino e infecção em melão**. 2013. 134f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Programa de pós-graduação em Agronomia. Universidade Estadual de Maringá, 2013.
- MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 19, p. 4321–4326, 1980.
- REHM, H. *Didymella bryoniae* (Awd.) Rehm. Ber. **Naturhist. Ver. Augsburg**, p.

26:27, 1881.

SANTOS, G. R. DOS; CAFÉ FILHO, A. C. Reação de genótipos de melancia ao crestamento gomoso do caule. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 945–950, 2005.

STEEKELENBURG, N. A. M. Factors influencing internal fruit rot of cucumber caused by *Didymella bryoniae*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 92, n. 2, p. 81–91, 1986.

SUDISHA, J. *et al.* 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.

VERZIGNASSI, J. R. *et al.* 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.; FERNANDES, J.; OLIVEIRA, R. R. Doenças em cultivo protegido: situação atual e perspectivas. In: ZAMBOLIM, L. *et al.* (Eds.). **Doenças em cultivo protegido: situação atual e perspectivas**. Viçosa: Universo, 2007. p. 91–114.

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

CAPÍTULO III

Desenvolvimento de escala de avaliação do Crestamento-gomoso-do-caule em caules de mini-melancia e meloeiro-nobre sob nova abordagem metodológica

3.1 RESUMO

Desenvolvimento de escala de avaliação do Crestamento-gomoso-do-caule em caules de mini-melancia e meloeiro-nobre sob nova abordagem metodológica. O crestamento-gomoso-do-caule, causado pelo fungo *Didymella bryoniae*, é uma das mais importantes doenças que afetam cucurbitáceas cultivadas. Entre elas a melancia e o melão figuram entre as culturas com maiores perdas relacionadas à doença. Em condições de cultivo protegido o crestamento-gomoso-do-caule pode se tornar um grande problema devido à perpetuação do inóculo e modificações na expressão da doença, com maior desenvolvimento de sintomas em caule em detrimento das folhas, devido às condições de cultivo diferenciadas em relação aos cultivos em campo aberto. Em função destas características, é importante o estudo do comportamento da doença em cultivo protegido e a criação de ferramentas de mensuração da doença para estas condições. Desta forma, este trabalho teve o objetivo de avaliar a sintomatologia do crestamento-gomoso-do-caule em caules de mini-melancia e melão-rendilhado cultivados em ambiente protegido e a criação de uma escala de avaliação da doença em caules de cucurbitáceas. Foram instalados cultivos de mini-melancia ‘Smile’ e meloeiro-nobre ‘Sunrise’ em cultivo protegido conduzidos sob diferentes sistemas de condução, visando obter a maior variabilidade de condições dentro deste ambiente. Foram realizadas avaliações da evolução dos sintomas nestas condições. Com base nas observações foi proposta uma escala de notas para a avaliação do crestamento-gomoso-do-caule em caules de cucurbitáceas. Foi possível correlacionar a área das lesões com o comprimento das lesões no caule através de regressão linear. A escala de avaliação apresentou precisão de 94,5% de atribuição correta de notas por avaliadores com o auxílio de fita métrica.

Palavras-chave: *Citrullus lanatus*, crestamento-gomoso-do-caule, escala de notas.

3.2 ABSTRACT

Development of disease scale of gummy-stem-blight in mini-watermelon and muskmelon under a new methodological approach. The gummy-stem-blight, caused by *Didymella bryoniae*, is one of the most important diseases affecting cultivated cucurbits. Among them, watermelon and melon are the crops with the highest losses related to the disease. Under protected environment, gummy-stem-blight can become a major problem due to the inoculum perpetuation and changes in disease expression when compared with field conditions, with more stem symptoms despite of leaf symptoms. Due to these characteristics, it is important the behavior study and the creation of tools to measure the disease for these conditions. In this way, this work had the objective to evaluate the symptomatology of the gummy-stem-blight on mini-watermelon and muskmelon stems grown in protected environment and the creation of a disease scale for disease evaluation in cucurbit stems. Were established mini-watermelon ‘Smile’ and muskmelon ‘Sunrise’ in protected environment under different breeding systems, to achieve the greatest variety of conditions within this environment. Were measured the symptoms evolution under these conditions. Based on the results, it was suggested a disease assessment scale of gummy-stem-blight in cucurbit stems. It was possible to correlate the area of stem lesions with their length through linear regression. The disease scale presented accuracy of 94.5% of correct assignment of scores by evaluators when aided by a tape measure.

Keywords: *Citrullus lanatus*, disease scale, epidemiology, gummy-stem-blight.

3.3 INTRODUÇÃO

O crestamento-gomoso-do-caule, causado pelo fungo *Didymella bryoniae* (Auersw.) (REHM, 1881) (sinon. *Mycosphaerella citrullina* (C.O. Sm.) Grossenb. – *Mycosphaerella melonis* (Pass.) W.F. Chiu & J.C. Walker), anamorfo *Ascochyta cucumis* (Fautrey; Roum [= *Phoma cucurbitacearum* (Fr.: Fr.) Sacc.]), ocorre em diversas espécies de cucurbitáceas de interesse econômico, entre elas melão e melancia, podendo afetar todas as partes das plantas, incluindo folhas, pecíolos, pedicelos, flores, pedúnculos, frutos e sementes (KEINATH, 2013a). Os sintomas surgem em caules e hastes na forma de cancrios de coloração variável de marrom claro a bege, com presença eventual de picnídios, encharcamento dos bordos e extravasamento de seiva; as lesões foliares apresentam aspecto necrótico com coloração marrom escuro e encharcamento dos bordos (PÉREZ *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2011).

A doença ocorre em todas as regiões produtoras do Brasil e é altamente devastadora em condições de campo e ambiente protegido (GASPAROTTO *et al.*, 2011; VIDA *et al.*, 2007; VIDA *et al.*, 1993). A mini-melancia cultivada em ambiente protegido e conduzida de forma similar ao melão pode apresentar os mesmos problemas, favorecidos pela escassez de variedades tolerantes à doença que sejam comercialmente aceitáveis (SANTOS e CAFÉ FILHO, 2013), pelo ambiente favorável ao desenvolvimento de lesões principalmente no caule e hastes, e baixa eficiência do controle químico (KEINATH, 2001).

A diversidade de ambientes nos quais são cultivadas as cucurbitáceas torna bastante variável a expressão dos sintomas de crestamento-gomoso-do-caule e por consequência dificulta a padronização da avaliação da doença. O controle climático parcial exercido em ambiente protegido favorece menor expressão de sintomas em folhas, porém a doença se torna de importante expressão em caules, favorecida pela baixa eficiência do controle químico nesse órgão, pela sucessão de ciclos de cultivo, perpetuação do inóculo no solo e transmissão via sementes (GASPAROTTO, 2010; MOURA, 2013).

Os sintomas mais frequentes ocorrem principalmente nos caules, pecíolos, folhas e frutos de *Cucurbitaceae* e se expressam como tombamento de plântulas, lesões nas hastes na região do colo da planta com exsudação de goma e manchas foliares (KEINATH, 2013a; PÉREZ *et al.*, 2012). Por ser bem adaptado a esta família, é capaz de colonizar rapidamente os

tecidos do hospedeiro e se reproduzir abundantemente (KEINATH, 2011). Lesões com crescimento ativo apresentam, geralmente aspecto encharcado devido à produção de enzimas que degradam as paredes celulares, mais especificamente a poligalacturonase (ZITTER, 1996). O crescimento das lesões nas folhas, caules e pecíolos levam à rápida morte dos tecidos. A planta toda pode murchar e morrer em função do colapso dos tecidos do caules e perda de área foliar. Em ambientes favoráveis ao desenvolvimento do patógeno foram relatados danos de até 60% na cultura da melancia (SANTOS *et al.*, 2005) e até 100% em melão rendilhado (VIDA *et al.*, 2004).

As manchas foliares são geralmente os primeiros sintomas notados e são os mais frequentemente usados na diagnose da doença. Na maioria dos hospedeiros os sintomas foliares surgem a partir das margens das folhas, e na medida que as lesões expandem, ocorre o coalescimento que resulta na seca das folhas que se tornam quebradiças (KEINATH, 2013a; KUROZAWA *et al.*, 2005). A cor e forma das lesões foliares variam entre os diferentes hospedeiros, porém algumas características são comuns. Podem apresentar formato arredondado, romboide ou triangular, particularmente nas lesões originadas dos bordos foliares. As lesões foliares são de coloração creme em pepino, marrom em melão, abóbora e abobrinha, e marrom-escuro em bucha e melancia (KEINATH, 2013a; PÉREZ *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2011). Podem ser notados anéis de coloração variando de marrom claro a escuro que correspondem ao crescimento do patógeno quando ocorre períodos de alternância de umidade (KEINATH, 2013a).

No caule as lesões surgem geralmente nos entrenós como manchas encharcadas que se tornam alongadas e necróticas na sua porção central, adquirindo coloração variando de marrom claro a acinzentado. Com o crescimento, a lesão circunda o caule e pode provocar o fendilhamento do tecido que se torna quebradiço levando ao surgimento de estrias e extravasamento de exsudado gomoso de coloração âmbar (AGRIOS, 2005; KEINATH, 2013a; SANTOS *et al.*, 2011).

Os sintomas nos frutos podem se expressar por podridão externa ou interna. Surgem inicialmente como áreas amareladas, irregularmente circulares que se tornam de coloração cinza a marrom e também podem apresentar exsudação na porção central, ao fim a lesão se torna escurecida. As lesões em frutos podem ser inicialmente superficiais, porém especialmente durante o armazenamento, o fungo penetra pelo interior do fruto até a cavidade das sementes (AGRIOS, 2005). Em melão pode ser encontrado crescimento micelial de coloração preta na

porção interna dos frutos afetados junto à cavidade das sementes. Em frutos de melancia os sintomas geralmente se iniciam pela porção terminal dos frutos, se expandindo rapidamente por todo o fruto (KEINATH, 2013a).

O crestamento-gomoso-do-caule pode ocorrer em plantas de melancia e melão ainda na fase de mudas. Nessas condições os sintomas iniciais geralmente são notados como manchas encharcadas no hipocótilo, na região de inserção dos cotilédones. Indicando a própria semente como fonte de inóculo (MUNKVOLD, 2009). Na fase de mudas também podem ocorrer lesões nos cotilédones, as quais geralmente provocam a seca prematura destes e posteriormente as lesões se estendem para o caule. Quando essas plantas sintomáticas são transplantadas para os locais definitivos e sobrevivem, podem desenvolver cancos a partir destas lesões, servindo de inóculo inicial para infecções mais severas (KEINATH, 2013a).

Diversos métodos de quantificação do crestamento-gomoso-do-caule já foram devidamente propostos e validados para avaliação de sintomas em folhas de melancia cultivada em condições de campo (SOUSA *et al.*, 2014); outras escalas de avaliação foram propostas para mudas de melancia e melão em fase de viveiro (GUSMINI *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2009; WOLUKAU *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 1997); para sintomas em caules na cultura do melão (DUSI *et al.*, 1994) e escalas descritivas para sintomas gerais em melancia e melão (SONG *et al.*, 2004; TSUTSUMI e DA SILVA, 2004). Porém, muitas destas escalas, principalmente para avaliação de sintomas em caules, foram constituídas com base apenas na experiência dos autores, com pouca distinção entre diferentes categorias de notas, ou não se basearam em uma análise morfológica dos sintomas, podendo levar a incorreções nas avaliações pelo enquadramento de diferentes severidades dentro da mesma categoria e em função da interpretação de diferentes avaliadores.

Considerando a forma de manifestação dos sintomas de crestamento-gomoso-do-caule em plantas cultivadas em ambiente protegido, se torna importante a mensuração das lesões provocadas por crestamento-gomoso-do-caule nesse ambiente. Assim se busca o ajuste de um método de quantificação da doença que seja simples, capaz de expressar a severidade real nas plantas e aplicável à rotina de avaliação da doença para fins de avaliação de resistência de germoplasma e pesquisas visando o controle da doença. Desta forma este trabalho tem o objetivo de avaliar a sintomatologia do crestamento-gomoso-do-caule em caules de mini-melancia e melão-rendilhado cultivados em ambiente protegido e propor e validar uma escala de avaliação da doença em caules de cucurbitáceas.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Sintomatologia do crestamento-gomoso-do-caule

Para o estudo da sintomatologia do crestamento-gomoso-do-caule (*Didymella bryoniae*) em condições de ambiente protegido, foram conduzidos dois ensaios em estufa plástica (setembro a dezembro de 2014 e fevereiro a maio de 2015) localizados nas dependências do campus sede da Universidade Estadual de Maringá, município de Maringá, Paraná, Brasil.

O ambiente protegido utilizado foi constituído de estufa plástica, modelo túnel alto, teto coberto com plástico de polietileno de baixa densidade, 150 micras e as laterais revestidas com tela anti-afídica (30 m de comprimento, 7 m de largura e pé-direito de 2,5 m).

Segundo a classificação climática de Köppen, o clima da região é do tipo Cfa, caracterizado por clima subtropical, temperatura média no mês mais frio inferior a 18 °C e temperatura média no mês mais quente acima de 22 °C, com verões quentes, geadas pouco frequentes concentração das chuvas nos meses de verão, porém sem estação seca definida (IAPAR, 2016).

Foram utilizadas sementes comerciais de mini-melancia híbrida ‘Smile’ (Takii seeds), e sementes de melão rendilhado híbrido ‘Sunrise’ (Takii seeds). Esses cultivares foram selecionados devido ao seu potencial de cultivo em ambiente protegido e susceptibilidade ao crestamento-gomoso-do-caule. As mudas foram produzidas em bandejas de EPS (poliestireno expandido), contendo substrato a base de casca de *Pinus* carbonizada e vermiculita. As mudas foram transplantadas para a estufa plástica aos 28 dias após a emergência, quando apresentavam a segunda folha definitiva em desenvolvimento inicial. Foi utilizado espaçamento de 0,5 m entre plantas e 1,0 m entre linhas de plantio.

O plantio foi realizado em três diferentes tipos de condução, plantio semi-hidropônico, plantio convencional no solo com cobertura tipo “mulching”, e plantio convencional no solo sem cobertura, de forma a melhor representar a variabilidade dos ambientes dentro do cultivo protegido. No sistema semi-hidropônico foram utilizados vasos plásticos contendo 12 L de areia lavada e o fornecimento de nutrientes foi realizado via gotejamento, utilizando solução nutritiva contendo, para cada volume de 1000L de água, 1.053 g de nitrato de cálcio, 500 g de sulfato de

magnésio hepta-hidratado, 217 g de fosfato monopotássico, 700 g de sulfato de potássio e 30 g de concentrado de micronutrientes contendo Fe-EDTA 7,26%; Cu-EDTA, 1,82%; Zn-EDTA 0,73%; Mn-EDTA 1,82%; B 1,82%; Mo 0,36% e Ni 0,335%. No sistema convencional com mulching, foi realizada adubação de base com 100 g/m linear do adubo 04-14-08, seguido do revolvimento do solo e cobertura com plástico preto de dupla camada. A adubação de cobertura foi realizada com o fornecimento de 30 g/planta de ureia e 30 g/planta de cloreto de potássio via água de irrigação. No sistema convencional sem cobertura, o preparo e condução foram iguais ao sistema com mulching, porém sem a cobertura com plástico, havendo necessidade de capina mecânica, a qual foi realizada semanalmente.

As plantas foram conduzidas segundo as recomendações de cultivo para a cultura do melão (BRANDÃO FILHO e VASCONCELLOS, 1998; FILGUEIRA, 2008) e de mini melancia em condições de ambiente protegido (CAMPAGNOL, 2009). As plantas foram conduzidas até a altura de 1,80 m amparadas por fitilho plástico. Quando as plantas atingiram a altura desejada, foi realizada a poda (capação) da gema apical. As plantas de melão foram conduzidas com haste única e as plantas de melancia conduzidas com duas hastes, derivadas a partir do primeiro entrenó. Foi realizada polinização manual das flores diariamente no período de florescimento das plantas.

As plantas foram monitoradas quanto ao surgimento e evolução dos sintomas de crestamento-gomoso-do-caule. As avaliações foram realizadas em nível populacional, considerando-se o número de lesões por planta, posição da lesão (número do entrenó de ocorrência da lesão considerando a partir do ponto de inserção das folhas cotiledonares), comprimento da lesão (cm), diâmetro da lesão (cm) e presença/ausência de exsudação de goma, picnídios e encharcamento dos tecidos nos bordos das lesões. Os resultados foram submetidos à análise descritiva.

3.4.2 Escala de Avaliação do crestamento-gomoso-do-caule

Para a elaboração da escala de avaliação de crestamento-gomoso-do-caule, foi realizada coleta das lesões com diferentes níveis de severidade de crestamento-gomoso-do-caule nos caules de plantas naturalmente infectadas de melancia e melão cultivadas a campo e em cultivo protegido. Foram selecionadas 168 imagens, de forma a compor um banco de dados da variabilidade e evolução dos sintomas de crestamento-gomoso-do-caule para estas espécies nas condições climáticas ocorridas durante os anos de 2014 e 2015.

As lesões nos caules foram inicialmente medidas em seu comprimento longitudinal, com o auxílio de escalímetro digital. O local das lesões foi previamente envolvido por filme plástico de PVC transparente, de forma a este ficar justaposto ao caule mantendo a lesão visível. Em seguida as bordas das lesões foram contornadas com marcador permanente sobre o filme de PVC, de forma a incluir as áreas necróticas e encharcadas das lesões. Sobre o filme de PVC marcado foi aderida uma camada de fita adesiva transparente com 1 cm de largura e o molde foi cortado longitudinalmente em relação ao caule, de modo a se obter um molde transparente, maleável e indeformável da área da lesão.

Os moldes planificados provenientes das lesões foram transferidos para folha de papel manteiga e digitalizados em figuras (JPEG) padronizadas tamanho 21 x 29,7 cm (A4) e resolução de 600 dpi (dots per inch). A área das lesões foi calculada através de análise digital das imagens pelo software Quant (VALE *et al.*, 2003).

A análise dos dados foi realizada por regressão linear entre o comprimento das lesões (variável independente) e a área das lesões (variável dependente), de forma a determinar o grau de correlação entre as variáveis.

A partir da constatação de correlação entre as variáveis e com base nas observações realizadas referentes à manifestação e evolução dos sintomas de crestamento-gomoso-do-caule, foi proposta uma escala de avaliação de crestamento-gomoso-do-caule em caules de cucurbitáceas. Na elaboração da escala de avaliação foi considerado tanto a severidade das lesões, expressa através da área lesionada (cm²), tanto os efeitos que as lesões podem provocar na planta de forma imediata e observável, como a murcha intermitente ou contínua da parte aérea ou mesmo a morte da planta. Desta forma se obteve uma escala categórica híbrida, que congrega hierarquicamente um fator qualitativo (efeito da lesão na planta) e outro quantitativo (área lesionada) para a definição da nota.

Visando formar uma base de dados de validação da escala proposta, foi implantada uma nova população de plantas nos meses de agosto a outubro de 2015. Foram estabelecidas 150 plantas de melão híbrido Sunrise e 150 plantas de mini-melancia híbrida ‘Smile’ em ambiente protegido. Todas as plantas foram cultivadas em solo descoberto com as mesmas características de condução descritas anteriormente.

Isolados de *D. bryoniae* foram obtidos a partir de plantas sintomáticas do ciclo de cultivo anterior. Para inoculação das plantas foram utilizadas colônias com 10 dias de crescimento

micelial mantidas em regime de 12 h de luz e 12 h de escuro, com temperatura de 24°C, cultivadas em placas de Petri contendo substrato BDA, de forma a acelerar a evolução e coleta dos sintomas. A inoculação das plantas foi realizada através do método do palito modificado (VERZIGNASSI *et al.*, 2004). Para tal, discos de meio de cultivo BDA contendo micélios de *D. bryoniae* foram retirados das bordas de colônias e transferidos para a superfície do caule das plantas previamente feridos por estilete. O disco foi fixado com fita adesiva e coberto com filme de PVC durante 48h. após esse período, o filme de PVC e o disco de micélio foram removidos. A inoculação foi realizada aos 20, 30 e 40 dias após o transplântio em 50 plantas de cada espécie por vez, de modo a se obter plantas com variados níveis de severidade no momento da validação.

Dentro da população de plantas sintomáticas foram selecionadas 100 plantas com lesões de crestamento-gomoso-do-caule a serem utilizadas para a validação da escala. As plantas lesionadas foram numeradas e as lesões foram medidas em comprimento com escalímetro digital, tomando-se como padrão o valor médio após quatro medições. As lesões então foram classificadas de acordo com as notas propostas, obtendo-se assim os valores padrões de medição.

No total de 15 avaliadores com e sem experiência em avaliações de doenças através de escalas foram convidados para atribuírem notas às lesões previamente definidas. Na primeira rodada de avaliação, cada avaliador realizou a classificação das lesões, portando apenas a descrição das categorias de notas em mãos, e sem o auxílio de outros instrumentos, considerando somente sua acuidade visual após treinamento prévio com a escala. Na segunda rodada de avaliações, foi realizada novamente a classificação das lesões, porém com o auxílio de uma fita métrica, graduada em centímetros, de forma a servir como gabarito para a atribuição das notas. Na segunda avaliação, os avaliadores anotaram a nota da lesão e o comprimento medido através de fita métrica.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística para determinar a acurácia, precisão e reprodutibilidade da escala categórica. Foi utilizada estatística Kappa (COHEN, 1960) modificada por Fleiss (1971), que mede o grau de concordância entre vários observadores, além do que seria esperado pelo acaso. Segundo Landis e Koch (1977) o índice Kappa é diretamente análogo aos coeficientes de correlação obtidos a partir de modelos ANOVA para dados quantitativos, podendo ser usado como medida de confiabilidade para dados categóricos entre múltiplos observadores.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Sintomatologia do crestamento-gomoso-do-caule

Os primeiros sintomas do crestamento-gomoso-do-caule surgiram logo nos primeiros dias após a emergência das plantas, sendo observados no caule, meristema apical ou nos cotilédones. As lesões no caule e meristema geralmente levaram à morte prematura das plantas, ainda na fase de bandeja. As lesões nos cotilédones surgiram como pontuações necróticas de coloração variando de marrom claro a marrom escuro, inicialmente notadas com diâmetro variando de 2 a 5 mm, porém podendo evoluir rapidamente, influenciada por alta umidade e temperatura elevada. As lesões nos cotilédones evoluíram radialmente podendo tomar todo o cotilédone e levar à sua senescência ainda na fase de bandeja, quando em condições muito favoráveis ao patógeno, ou levaram à senescência nos primeiros dias após o transplântio. Após a senescência dos cotilédones afetados, em muitas plantas pode-se notar a extensão dos sintomas até o caule, na região de inserção dos cotilédones.

Os dados da ocorrência de sintomas em caules podem ser observados na Figura 3.1. Para a realização da avaliação, considerou-se a porção acima da inserção dos cotilédones no caule como o primeiro entrenó. A maior frequência de sintomas pôde ser observada no primeiro e segundo entrenós, respectivamente com 21,24% e 26,42% do total de sintomas observados. Havendo decréscimo gradual da frequência dos sintomas entre o terceiro e sétimo entrenós. A partir do oitavo até o 18º entrenó, foram observados apenas sintomas esporádicos do crestamento-gomoso-do-caule.

Segundo os dados levantados a maior incidência dos sintomas surgiram na base do caule e decresceram gradualmente até o sétimo entrenó. Essa característica pode estar associada à fonte de infecção primária originada das sementes ou cotilédones das plantas (KEINATH, 2013a; SUDISHA *et al.*, 2006). A infecção primária ocorre pela germinação dos esporos localizados nas sementes, os quais infectam a plântula e promovem o desenvolvimento de inóculo conidial nos cotilédones, servindo de base para a infecção sistêmica via tronco ou infecção foliar secundária através dos conídios formados (MCGEE, 1995).

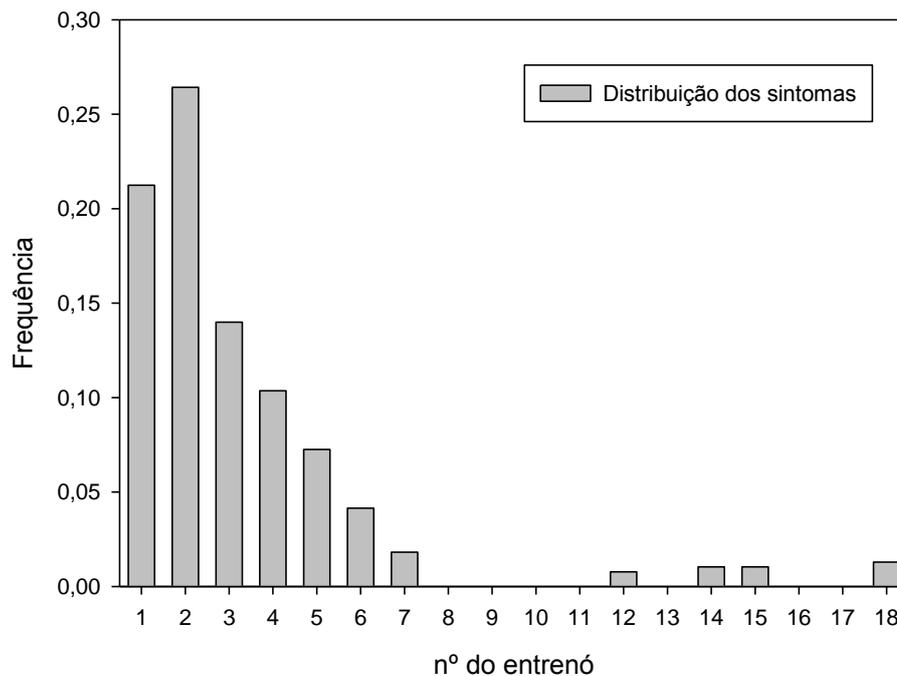


Figura 3.1 – Distribuição da ocorrência de sintomas de crestamento-gomoso-do-caule (*D. bryoniae*) nos entrenós dos caules da população de plantas avaliada. Maringá-PR, 2017.

Os resultados do tamanho das lesões podem ser observados na Figura 3.2. Considerando as características das lesões, o melhor parâmetro de avaliação do tamanho das lesões do crestamento-gomoso-do-caule foi a medida do comprimento longitudinal no caule, parâmetro que apresentou forte correlação com a área lesionada. Os resultados mostram o tamanho médio as lesões encontradas na população de plantas ao longo de quatro avaliações realizadas durante o ciclo das culturas. A maior frequência de sintomas foi observada com tamanho entre 31 a 60 mm de comprimento (43%). Nessa faixa de comprimento as lesões iniciaram o anelamento do caule, limitando a capacidade de crescimento da planta. Parte considerável das lesões evoluíram até 100 mm (28%) ou 160 mm (5%) de comprimento. Lesões maiores geralmente ocorreram em função do coalescimento de lesões adjacentes.

Com relação à taxa de crescimento das lesões ao longo do tempo, houve grande variação entre diferentes plantas. De forma geral, lesões que apresentavam exsudação de goma (34,9% das lesões) ou encharcamento dos tecidos (49,6% das lesões) cresceram mais rapidamente que lesões com aspecto seco ou corticoso.

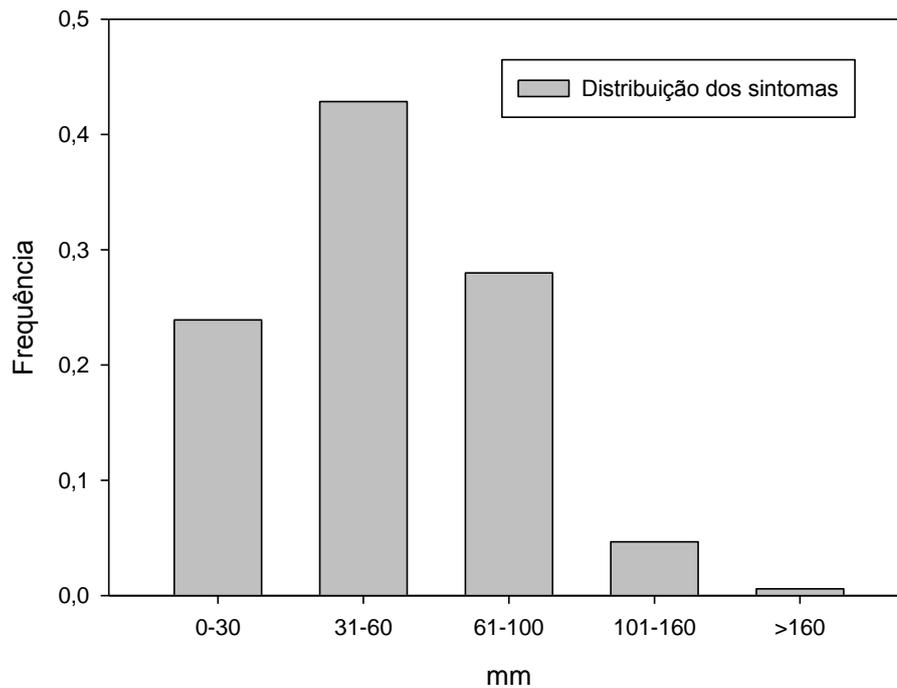


Figura 3.2 – Distribuição do comprimento das lesões de cretamento-gomoso-do-caule (*D. bryoniae*) em caules de plantas de melancia, agrupados por categorias. Maringá-PR, 2017.

Outras lesões provocadas por *D. bryoniae* nas demais partes das plantas como folhas e frutos foram monitoradas, porém não foram observadas lesões em frutos e apenas registraram-se lesões esporádicas nas folhas de ambas as culturas de melancia e melão. Os sintomas foliares observados por Santos e Café Filho (2005) na cultura da melancia em condições de campo atingiram níveis acima de 70% da área foliar afetada, influenciado principalmente pelo período de molhamento foliar elevado. Essas observações reforçam a ocorrência de alteração na expressão dos sintomas do cretamento-gomoso-do-caule em condições de ambiente protegido. Pois foi observada notáveis variações na expressão dos sintomas em função do ambiente diferenciado, na qual a condução vertical das plantas e a irrigação via gotejamento favoreceram a manutenção do dossel foliar seco, mantendo baixa a expressão dos sintomas foliares. De forma similar, esses mesmos fatores contribuíram para a ocorrência de torções nos caules devido ao tutoramento e elevada umidade na região do colo das plantas, favorecendo a expressão dos sintomas em caules.

3.5.2 Escala de Avaliação do crestamento-gomoso-do-caule

3.5.2.1 Desenvolvimento da escala de avaliação

Através da análise das imagens digitais geradas a partir dos caules analisados, foi possível determinar a relação entre a área e o comprimento das lesões ao longo do eixo do caule. Ou seja, a partir da determinação do comprimento da lesão foi possível estimar a área da lesão através de um modelo de regressão linear simples. Os dados da regressão linear são apresentados na

Figura 3.3 3.3, e a equação obtida a partir do conjunto de dados foi:

$$y = 2,505x + 0,089 \quad (r^2 = 0,80)$$

Onde:

y = área da lesão em cm^2 ;

x = comprimento da lesão em cm ;

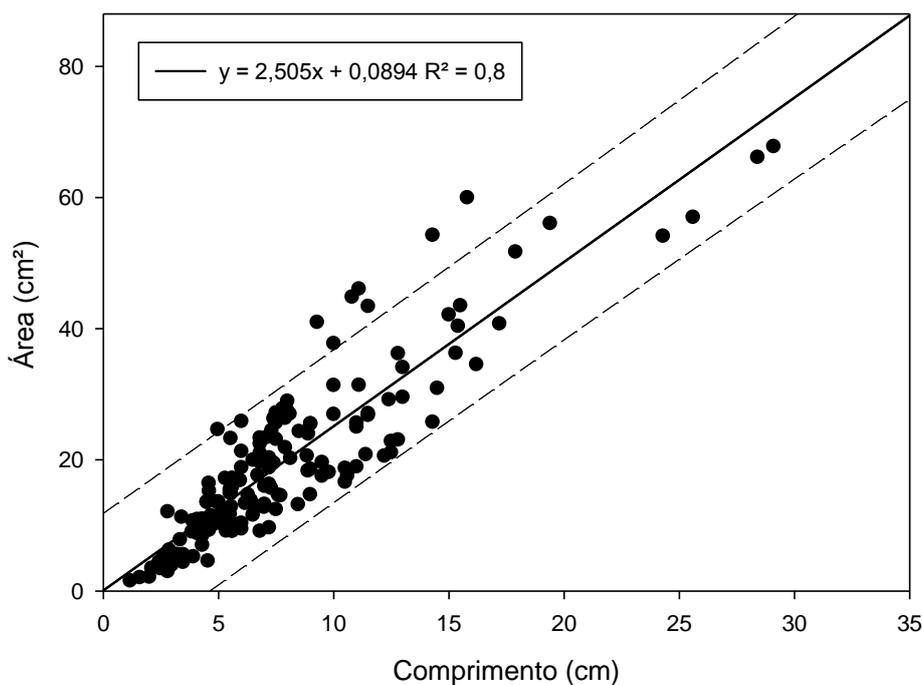


Figura 3.3 – Regressão linear entre o comprimento da lesões e área de tecido lesionado por crestamento-gomoso-do-caule em plantas de melancia e melão. Maringá-PR, 2017.

De forma um pouco diferente das lesões em folhas, cuja área se relaciona diretamente com os prejuízos à planta (geralmente redução da fotossíntese pela perda da área foliar), as lesões em caules podem causar prejuízos severos ao desenvolvimento da planta mesmo ainda pequenas, quando estas comprometem o fluxo de seiva, tanto ascendente quanto descendente na planta. Nestes casos, porém, ainda persiste a relação de que quanto maior o tamanho da lesão maior o potencial desta provocar esse tipo de prejuízo. Desta forma, na elaboração desta escala foi considerado um fator quantitativo, que representa o tamanho das lesões e também os fatores qualitativos, que podem ser interpretados como os efeitos provocados pelas lesões sobre o desenvolvimento da planta. No caso de crestamento-gomoso-do-caule esses efeitos podem ser interpretados de forma mais prática como a murcha intermitente ou permanente da planta acima da área lesionada, ou a morte da planta.

A escala de avaliação proposta com base na observação dos sintomas foi composta por sete categorias, descritas no Quadro 3.1. São cinco categorias quantitativas, que consideram o tamanho das lesões e duas qualitativas, que representam o efeito de murcha e morte da parte aérea da planta. É importante ressaltar que as categorias qualitativas (6 e 7) sobrepõem-se a qualquer categoria quantitativa (1 a 5), ou seja, quando se observa murcha ou morte da planta considera-se o dano como irreversível à planta, atribuindo-se as notas mais elevadas de severidade, independente do comprimento da lesão.

Quadro 3.1– Escala de avaliação de Crestamento-gomoso-do-caule, causado por *Didymella bryoniae*, em caules de cucurbitáceas. Maringá-PR, 2017.

Categoria	Descrição
0	Planta sem sintomas
1	Lesão até 3 cm de comprimento (até 7,5 cm ²);
2	Lesão de 3,1 a 6 cm de comprimento (até 15,0 cm ²);
3	Lesão de 6,1 a 10 cm de comprimento (até 25 cm ²);
4	Lesão de 10,1 a 16 cm de comprimento (até 40,0 cm ²);
5	Lesão maior que 16 cm de comprimento (maior que 40,0 cm ²);
6	Murcha da parte aérea, independentemente do tamanho da lesão;
7	Morte da planta independentemente do tamanho da lesão.

3.5.2.2 Validação da escala de avaliação

A partir das notas atribuídas pelos avaliadores na população de validação, foi realizada a classificação das notas em categorias de assertividade (Tabela 3.1). A porcentagem de acerto na atribuição das notas ficou em 73,2% quando a avaliação foi realizada sem o auxílio de régua. A atribuição errada de uma nota em uma categoria superior ocorreu em 10,3% dos casos e inferior em 14%. Enquanto que a atribuição errada em uma categoria distante foi de apenas 2,5%. Quando a avaliação ocorreu com o auxílio da régua, a atribuição correta de notas subiu para 94,5%, enquanto a atribuição incorreta em uma categoria superior foi de apenas 2,9% e em uma categoria inferior foi de 1,8%. A atribuição em uma categoria distante foi de apenas 0,7%.

É importante considerar que o comprimento dos caules avaliados impossibilita ao avaliador ter a mesma perspectiva de proporção de tecido lesionado em detrimento do tecido sadio em relação à que este teria em uma avaliação em folhas, onde todo o órgão avaliado fica dentro do campo de visão do avaliador. Em função destas características se notou aumento da assertividade de atribuição de notas quando o avaliador dispunha de um gabarito de referência em mãos, o que aumentou de maneira expressiva a atribuição correta das notas.

Tabela 3.1- Classificação das notas atribuídas pelos avaliadores sem e com o uso de régua em função das categorias: correta, adjacente superior, adjacente inferior e distante. Maringá-PR, 2017.

Classificação sem régua				
Classificação*	Nº Absoluto	Nº Acumulado	% Absoluto	% Acumulado
Categoria correta	1098	1098	73,2%	73,2%
Categoria adjacente (+)	155	1253	10,3%	83,5%
Categoria adjacente (-)	210	1463	14,0%	97,5%
Categoria distante	37	1500	2,5%	100,0%
Classificação com régua				
Classificação	Nº Absoluto	Nº Acumulado	% Absoluto	% Acumulado
Categoria correta	1418	1418	94,5%	94,5%
Categoria adjacente (+)	44	1462	2,9%	97,5%
Categoria adjacente (-)	27	1489	1,8%	99,3%
Categoria distante	11	1500	0,7%	100,0%

*Categoria correta: Nota atribuída é igual nota real; Categoria Adjacente: Nota atribuída está uma posição acima ou abaixo da nota real; Categoria distante: Nota atribuída está a duas ou mais posições distantes da nota real.

Os dados obtidos foram analisados quanto ao grau de confiabilidade entre observadores através da estatística Kappa, e estão relacionados na Tabela 3.2. O índice Kappa pode variar de -1 a 1, e quanto mais distante de 0, maior a concordância entre os observadores. A correlação foi considerada moderada quando entre 0,41-0,60; média entre 0,61 a 0,80; e alta quando entre 0,81-1,00 (LANDIS e KOCH, 1977).

Pelos resultados obtidos observa-se que na primeira avaliação realizada sem o auxílio de régua ocorreu alta concordância nas categorias qualitativas 0, 6 e 7, porém nas categorias quantitativas a correlação foi considerada baixa ou moderada, refletindo pobre concordância entre os diferentes observadores para estas notas, o que levou ao índice Kappa geral de 0,55, classificado como de moderada concordância. Esses resultados confirmam a maior dificuldade de avaliação visual das características quantitativas pelos avaliadores em detrimento da avaliação das características qualitativas de murcha ou morte das plantas. Na qual a presença de um gabarito referencial levou a maior número de atribuições corretas de notas.

Já na segunda avaliação realizada com o auxílio de régua, houve aumento expressivo na concordância entre avaliadores nas categorias quantitativas, enquanto que nas categorias qualitativas se mantiveram nos mesmos patamares. Isso refletiu no índice Kappa geral, que ficou em 0,88, sendo considerando com alta concordância entre avaliadores.

Tabela 3.2 - Resultados da Estatística Kappa para categorias individuais e índice Kappa geral, com e sem o uso de régua. Maringá-PR, 2017.

Avaliação	Notas							Geral	
	0	1	2	3	4	5	6		7
	<i>Kappa</i>								
Sem régua	1,00	0,63	0,52	0,46	0,38	0,49	0,94	0,93	0,55
Com régua	0,95	0,77	0,92	0,88	0,88	0,81	0,88	0,89	0,88

*Todos os resultados apresentaram p-valor <0,001.

Na Tabela 3.3 são mostrados os escores individuais por avaliador das notas atribuídas sem o uso de régua e com o auxílio do instrumento. O uso da régua contribuiu significativamente para o aumento na precisão das classificações realizadas pelos avaliadores. Em todos os casos houve aumento nas atribuições precisas, sendo esse efeito maior entre os avaliadores que foram menos precisos sem o uso de régua.

Os cinco avaliadores que obtiveram precisão menor que 70% sem o uso da régua, melhoraram seus índices com o uso do instrumento, ficando todos acima de 86%, mantendo precisão equivalente aos demais avaliadores.

Tabela 3.3 – Precisão dos avaliadores na atribuição de notas de severidade de Crestamento-gomoso-do-caule em plantas de melão e melancia, sem o uso de régua e com o uso de régua. Maringá-PR, 2017.

Avaliador	Sem régua				Com régua			
	E x a t o	Adjacente +	Adjacente -	Distante	E x a t o	Adjacente +	Adjacente -	Distante
1	82	8	9	1	91	6	3	0
2	43	47	2	8	87	11	2	0
3	76	7	13	4	92	4	2	2
4	81	3	12	4	96	2	0	2
5	84	3	13	0	97	0	2	1
6	69	1	30	0	96	4	0	0
7	45	4	40	11	86	6	5	3
8	85	13	2	0	97	1	2	0
9	78	16	6	0	97	0	3	0
10	59	18	18	5	96	1	3	0
11	82	5	13	0	94	3	1	2
12	68	5	26	1	96	3	1	0
13	84	6	9	1	96	2	1	1
14	84	6	10	0	99	1	0	0
15	78	13	7	2	98	0	2	0

O uso da escala de notas na avaliação do crestamento-gomoso-do-caule em plantas cultivadas em ambiente protegido contribuiu para parametrizar a mensuração das lesões com base nas observações da evolução da doença realizadas em ambientes protegido. Sua utilização pode contribuir para aumentar a precisão dos avaliadores e sua assertividade na atribuição das notas, além de garantir resultados com maior qualidade mesmo entre avaliadores com baixa experiência.

Esta escala trouxe uma nova abordagem na avaliação de doenças de plantas ao (i) tornar prática a avaliação de lesões de natureza tridimensional presentes em caules, (ii) categorizar fatores quantitativos e qualitativos de forma combinada na avaliação da severidade da doença;

e (iii) introduzir o conceito de correlação entre e intra-observador na avaliação de doenças de plantas.

Neste trabalho foi implementada uma nova metodologia para quantificação de lesões em caules. As lesões em caules são de mais difícil avaliação visual em função de sua natureza tridimensional, exigindo assim um padrão específico de avaliação até então não disponível para este patossistema. Desta forma, a criação e validação desta escala de avaliação tornou mais prática e assertiva a avaliação do crestamento-gomoso-do-caule na cultura da mini-melancia e meloeiro nobre e pode servir de base para a adaptação de escalas de avaliação para outros patossistemas com características similares ao abordado neste trabalho.

3.6 CONCLUSÕES

A partir da observação da sintomatologia de crestamento-gomoso-do-caule em plantas de mini-melancia e melão-rendilhado, cultivadas em cultivo protegido, foi possível observar correlação existente entre a área lesionada nos caules com o comprimento das lesões.

A partir do padrão de evolução dos sintomas nas plantas de mini-melancia e melão-rendilhado cultivadas em cultivo protegido, foi possível a proposição e validação de uma escala de avaliação de sintomas da doença em caules de cucurbitáceas como ferramenta na avaliação de sintomas em caules.

3.7 REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5th Edition. Elsevier Academic Press, 2005.
- BRANDÃO FILHO, J. U. T.; VASCONCELLOS, M. A. S. A cultura do meloeiro. In: GOTO, R.; TIVELLI, S. W. (Org.). **Produção de hortaliças em ambiente protegido: condições subtropicais**. p. 161–194. São Paulo: Fundação Editora da UNESP, 1998.
- CAMPAGNOL, R. **Sistemas de condução de mini melancia cultivada em ambiente protegido**. (Dissertação). 1-80 f. Universidade de São Paulo, ESALQ, 2009.
- COHEN, J. A coefficient of agreement for nominal scales. **Educational and Psychological Measurement**, v. 20, p. 37–46, 1960.
- DUSI, A. N.; TASAKI, S.; VIEIRA, J. Metodologia para avaliação de resistência a *Didymella bryoniae* em melão. **Horticultura Brasileira**, v. 12, n. 1, p. 43–44, 1994.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2 ed. rev. Viçosa: UFV, 2008.
- FLEISS, J. L. Measuring nominal scale agreement among many raters. **Psychological Bulletin**, v. 76, p. 378–382, 1971.
- GASPAROTTO, F. **Transmissão e controle de *Didymella bryoniae* em meloeiro nobre**. 2010. 169f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Programa de pós-graduação em Agronomia. Universidade Estadual de Maringá, 2010.
- GASPAROTTO, F. *et al.* Infecção latente de *Didymella bryoniae* em meloeiro nobre. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 62–64, 2011.
- GUSMINI, G.; WEHNER, T. C.; HOLMES, G. J. Disease Assessment Scales for Seedling Screening and Detached Leaf Assay for Gummy Stem Blight in Watermelon. **Cucurbit Genetics Cooperative Report**, v. 25, p. 36–40, 2002.
- IAPAR. **Cartas climáticas do Paraná**. Disponível em: <<http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=863>>. Acesso em: 25 jun. 2016.

KEINATH, A. P.; Diagnostic Guide for Gummy Stem Blight and Black Rot on Cucurbits. **Plant Health Progress**. 2013a.

KEINATH, A. P. From native plants in central Europe to cultivated crops worldwide: The emergence of *Didymella bryoniae* as a cucurbit pathogen. **HortScience**, v. 46, n. 4, p. 532–535, 2011.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A.; REZENDE, J. A. M. Doenças das cucurbitáceas. In: KIMATI, H. *et al.* (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Doença das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 293–310.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159, 1977.

MCGEE, D. C. Epidemiological approach to disease management through seed technology. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 33, p. 445–466, 1995.

MOURA, G. S. **Transmissão, detecção e controle de *Didymella bryoniae* em pepino e infecção em melão**. 2013. 134f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Programa de pós-graduação em Agronomia. Universidade Estadual de Maringá, 2013.

MUNKVOLD, G. P. Seed pathology progress in academia and industry. **Annual review of phytopathology**, v. 47, p. 285–311, 2009.

PÉREZ, J. *et al.* Sintomatología e identificación del agente causal del tizón gomoso del tallo en sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum y Nakai) en la isla de la Juventud. **Protección Vegetal**, v. 27, n. 1, p. 13–18, 2012.

REHM, H. *Didymella bryoniae* (Awd.) Rehm. Ber. **Naturhist. Ver. Augsburg**, p. 26:27, 1881.

SANTOS, G. R. *et al.* Crestamento gomoso do caule da melancia: Etiologia, epidemiologia e medidas de controle. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. 2, p. 52–58, 2011.

SANTOS, G. R. DOS *et al.* Progresso do crestamento gomoso e perdas na cultura da melancia. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 2, p. 228–232, jun. 2005.

SANTOS, G. R. DOS; *et al.* Reação de genótipos de melancia ao crestamento gomoso do caule. **Horticultura Brasileira**, v. 31, p. 540–548, 2013.

SANTOS, G. R. DOS; CAFÉ FILHO, A. C. Reação de genótipos de melancia ao crestamento gomoso do caule. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 945–950, dez. 2005.

SANTOS, G. R. DOS; *et al.* Host specificity and genetic diversity of *Didymella bryoniae* from cucurbitaceae in Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 157, p. 265–273, 2009.

SONG, R.; GUSMINI, G.; WEHNER, T. C. Screening the watermelon germplasm collection for resistance to gummy stem blight. **Acta Horticulturae**, v. 637, p. 63–68, 2004.

SOUSA, S. C. R. *et al.* Diagrammatic scale for evaluation of gummy stem blight severity in watermelon. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 5, p. 1314–1324, 2014.

TSUTSUMI, C. Y.; DA SILVA, N. Screening of melon populations for resistance to *Didymella bryoniae* in greenhouse and plastic tunnel conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 2, p. 171–177, 2004.

VALE, F. X. R.; FERNANDES FILHO, E. I.; LIBERATO, J. R. QUANT. A software for plant disease severity assessment. **8th International Congress of Plant Pathology**, v. 8, p. 105, 2003.

VERZIGNASSI, J. R.; *et al.* 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.; SOUTO, E. R.; NUNES, W. M. C.; Perdas causadas por *Mycosphaerella melonis* na cultura do melão em estufas plásticas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 18, n. (S), p. 324, 1993.

VIDA, J. B.; FERNANDES, J.; OLIVEIRA, R. R. Doenças em cultivo protegido: situação atual e perspectivas. In: ZAMBOLIM, L. *et al.* (Eds.). **Doenças em cultivo protegido: situação atual e perspectivas**. Viçosa: Universo, 2007. p. 91–114.

VIDA, J. B.; *et al.* Controle da podridão gomosa em melão rendilhado em cultivo protegido por sanitização de ferramenta de poda. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 6, p. 626–630, 2004.

WOLUKAU, J. N. *et al.* Resistance to gummy stem blight in melon (*Cucumis melo* L.) germplasm and inheritance of resistance from plant introductions 157076, 420145, and 323498. **HortScience**, v. 42, n. 2, p. 215–221, 2007.

ZHANG, Y. *et al.* Screening melon (*Cucumis melo*) for resistance to gummy stem blight in the greenhouse and field. **HortScience**, v. 32, n. 1, p. 117–121, 1997.

ZITTER, T. A. Black rot. In: ZITTER, T. A.; THOMAS, C. E.; HOPKINS, D. L. (Org.). **Compendium of Cucurbit Diseases**. St. Paul, MN.: American Phytopathological Society Press, 1996.