

SÔNIA MARIA SALOMÃO ARIAS

**ASPECTOS DA DETECÇÃO EM SEMENTES E CONTROLE
BIOLÓGICO DE *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* EM SOJA
[*Glycine max* (L.) Merrill]**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitossanidade, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. JOSÉ DA CRUZ MACHADO

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1995**

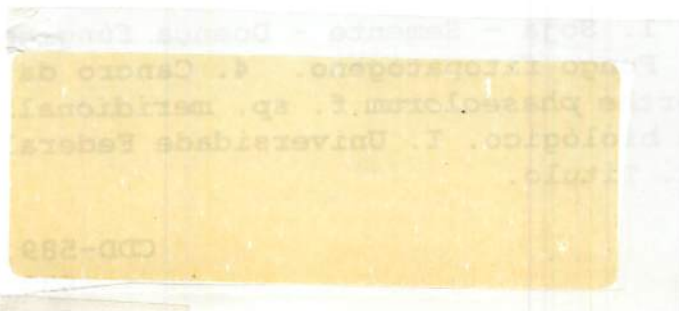
SÔNIA MARIA SALOMÃO ARIAS

**ASPECTOS DA DETECÇÃO EM SEMENTES E CONTROLE
BIOLÓGICO DE *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* EM SOJA
[*Glycine max* (L.) Merrill]**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitossanidade, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. JOSÉ DA CRUZ MACHADO



**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1995**

FICHA CATALOGRÁFICA PREPARADA PELA SEÇÃO DE CATALOGAÇÃO E
CLASSIFICAÇÃO DA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFLA

Arias, Sônia Maria Salomão.

Aspectos da detecção em sementes e controle biológico de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* em soja [*Glycine max* (L.) Merrill] / Sônia Maria Salomão Arias. --Lavras : UFLA, 1995.

76 p. : il.

Orientador: José da Cruz Machado.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Soja - Semente - Doença fúngica. 2. Fungo.
3. Fungo fitopatogénico. 4. Cancro da haste. 5. *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*. 6. Controle biológico. I. Universidade Federal de Lavras.
II. Título.

CDD-589.2

-633.3421

-633.3494

SÔNIA MARIA SALOMÃO ARIAS

**ASPECTOS DA DETECÇÃO EM SEMENTES E CONTROLE
BIOLÓGICO DE *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* EM SOJA
[*Glycine max* (L.) Merrill]**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitossanidade, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 30 de agosto de 1995



Pesq. Elizabeth de Oliveira



Prof. Mario Sobral de Abreu



Prof. José da Cruz Machado
(Orientador)

A Deus, pela vida.

Aos meus pais,
Elias Salomão (in memorian),
Helena Pivaro Salomão,
e minha Tia Julieta Salomão (in memorian),
por minha formação;

A meus irmãos Gilberto Antônio e
Maria Helena, pela compreensão e
amizade.

OFEREÇO

Ao meu esposo Edison e
minha filha Laís.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Empresa de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural de Mato Grosso do Sul (EMPAER - MS), pela oportunidade oferecida para a realização do curso de Pós - Graduação;

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Fitossanidade, pela oportunidade concedida para a realização do curso de Pós - Graduação;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio concedido;

Ao professor José da Cruz Machado pela orientação;

À pesquisadora Elizabeth de Oliveira e ao professor Mario Sobral de Abreu pelas sugestões apresentadas a este trabalho;

A todos os professores do Departamento de Fitossanidade da UFLA pela atenção;

À minha mãe pelo amor, compreensão e apoio constantes durante o curso;

Ao meu esposo e companheiro Edison R. A. Arias pelo apoio na execução das análises estatísticas, e principalmente, pela compreensão, paciência e valiosas sugestões;

À minha filha, perdão pelos momentos de ausência;

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade pela dedicação e colaboração, durante os trabalhos realizados;

Aos funcionários da Biblioteca Central da UFLA, pelo apoio e colaboração;

A todos aqueles que de alguma forma manifestaram colaboração, apoio e incentivo para o êxito deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Teste de sanidade para detecção de fungos em sementes de soja	3
2.2 Aspectos morfológicos, culturais e patológicos de <i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i>	5
2.3 Controle Biológico e Químico do cancro da haste de soja	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
3 ASPECTOS CULTURAIS E PATOGÊNICOS DE ISOLADOS DE <i>Diaporthe</i> <i>phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i> EM RELAÇÃO A OUTROS COMPONENTES DO COMPLEXO <i>Diaporthe/Phomopsis</i>	25
RESUMO	25
SUMMARY	26
3.1 INTRODUÇÃO	26
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.2.1 Obtenção e cultivo de <i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i>	28
3.2.2 Condução do experimento	28
3.2.3 Obtenção de isolados à partir de sementes de soja oriundas de diferentes localidades geográficas	29
3.2.4 Patogenicidade dos isolados do complexo <i>Diaporthe/Phomopsis</i> à cultivar FT - Cristalina	31
3.2.4.1 Preparo do inóculo	31
3.2.4.2 Inoculação e condução do experimento	31
3.2.5 Caracterização cultural de diferentes isolados de <i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i> em diferentes meios de cultura	33
3.2.6 Condução dos testes de sanidade	35
3.2.7 Características fenotípicas dos patógenos sobre sementes inoculadas simultaneamente com <i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i> e com <i>Phomopsis</i> sp.	36

	Página
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.3.1 Efeito de 2,4-D sobre o crescimento micelial de <i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i>	37
3.3.2 Comparação de <i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i> com os demais membros do complexo <i>Diaporthe/Phomopsis</i> quanto a patogenicidade e aspectos culturais	38
3.3.2.1 Patogenicidade dos isolados do complexo <i>Diaporthe/Phomopsis</i> à cultivar FT - Cristalina	38
3.3.2.2 Caracterização cultural de diferentes isolados do complexo <i>Diaporthe/Phomopsis</i> em diferentes meios de cultura	40
3.3.3 Avaliação do comportamento de <i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i> e de <i>Phomopsis</i> sp. em sementes de soja artificialmente inoculadas, e em condições de teste de sanidade	47
3.3.3.1 Condução dos testes de sanidade	47
3.3.3.2 Características fenotípicas dos patógenos sobre sementes inoculadas simultaneamente com <i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i> e <i>Phomopsis</i> sp.	49
3.4 CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
4 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTAGÔNICO DE <i>Penicillium aurantiogriseum</i> A <i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i> "IN VITRO"	54
RESUMO	54
SUMMARY	54
4.1 INTRODUÇÃO	55
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	56
4.2.1 Obtenção e preparo dos isolados em estudo	56
4.2.2 Avaliação do efeito antagonista "in vitro"	56
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.4 CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
5 SENSIBILIDADE "IN VITRO", DE <i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i> AO FUNGICIDA THIRAM EM COMBINAÇÃO COM <i>Penicillium aurantiogriseum</i>	65
RESUMO	65
SUMMARY	65
5.1 INTRODUÇÃO	66
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	67
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.4 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Procedência e natureza do material utilizado para obtenção dos isolados	30
2	Agrupamento dos isolados de <i>Phomopsis</i> spp. obtidos de sementes procedentes de diferentes regiões geográficas e através de incubação pelo teste padrão de sanidade "Blotter Test". UFLA - Lavras, 1995	39
3	Nota média de severidade obtida em plântulas de soja em casa de vegetação através de inoculação dos diferentes isolados do complexo <i>Diaporthe/Phomopsis</i> . UFLA - Lavras, 1995	40
4	Taxa de crescimento micelial (mm/24 h) dos isolados de <i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i> e de <i>Phomopsis</i> sp. em diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação. UFLA - Lavras, 1995	41
5	Agrupamento dos isolados do complexo <i>Diaporthe/Phomopsis</i> em soja, em função de suas características culturais em diferentes meios de cultura e temperaturas. UFLA - Lavras, 1995	43
6	Agrupamento dos isolados do complexo <i>Diaporthe/Phomopsis</i> em função da coloração micelial da colônia nos diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação. UFLA - Lavras, 1995	44
7	Incidência de <i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i> e <i>Phomopsis</i> sp. em sementes de soja inoculadas artificialmente. UFLA - Lavras, 1995	48
8	Redução do crescimento micelial de <i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i> por <i>Penicillium aurantiogriseum</i> , em culturas pareadas e incubadas em diferentes temperaturas, no meio BDA. UFLA - Lavras, 1995 ...	59
9	Diâmetro médio do crescimento micelial de <i>Penicillium aurantiogriseum</i> em diferentes temperaturas em culturas pareadas com <i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i> , no meio BDA. UFLA - Lavras, 1995	60

Tabela		Página
10	Diâmetro médio da colônia de <i>Penicillium aurantiogriseum</i> em sistema de sobreposição com <i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i> , sobre meio BDA. UFLA - Lavras, 1995	61
11	Redução do crescimento micelial (RC) de <i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i> por <i>Penicillium aurantiogriseum</i> com 72 horas de crescimento em culturas pareadas em meio BDA em diferentes condições de incubação. UFLA - Lavras, 1995	61
12	Diâmetro médio (mm) do crescimento micelial de <i>Penicillium aurantiogriseum</i> em diferentes temperaturas, em culturas pareadas com <i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i> , em meio BDA, plaqueadas com 72 h de antecedência ao pareamento. UFLA - Lavras, 1995	62
13	Porcentagem média de redução de crescimento de <i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i> , na presença de <i>Penicillium aurantiogriseum</i> e em meio BDA contendo fungicida thiram. UFLA - Lavras, 1995	68
14	Porcentagem de redução de crescimento de <i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i> , na presença de <i>Penicillium aurantiogriseum</i> em meio BDA e em diferentes concentrações de thiram. UFLA - Lavras, 1995	70

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Efeito de 2,4-D sobre o crescimento micelial de <i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i> , sob temperatura de 21 (± 2)°C. UFLA - Lavras, 1995	37
2	Taxa de crescimento micelial-TCM (%) dos isolados de <i>Phomopsis</i> spp. em diferentes meios de cultura. UFLA - Lavras, 1995	42
3	Taxa de crescimento micelial-TCM (%) dos isolados de <i>Phomopsis</i> spp. em diferentes temperaturas. UFLA - Lavras, 1995	42
4	Aspectos das colônias de <i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i> (Dpm) e <i>Phomopsis</i> sp. (P.sp.) em diferentes substratos e condições de incubação (21°C e 25°C). UFLA - Lavras, 1995	46
5	Modelo do método de pareamento e de sobreposição de discos de ágar e papel de filtro. UFLA - Lavras, 1995	57
6	Efeito dos tratamentos químico e biológico na redução (%) do crescimento micelial de <i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i> . UFLA - Lavras, 1995	69
7	Redução (%) do crescimento de <i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i> "in vitro", por <i>Penicillium aurantiogriseum</i> e thiram à 20(± 2)°C. UFLA - Lavras, 1995	70
8	Redução (%) do crescimento de <i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i> "in vitro", por <i>Penicillium aurantiogriseum</i> e thiram à 25(± 2)°C. UFLA - Lavras, 1995	71

1 INTRODUÇÃO

Com a expansão da cultura da soja nas últimas décadas, tem havido um aumento na ocorrência e intensidade de doenças, podendo algumas atingirem níveis epidêmicos, reduzindo drasticamente a produção.

A veiculação de sementes não certificadas e/ou recomendadas de uma região ou estado para outro, é um fator responsável pela introdução de alguns patógenos em áreas indenés.

Os patógenos de soja são em sua maioria de natureza fúngica, sendo que muitos podem ser transmitidos pelas sementes. Exemplo de doença importante disseminada através de sementes é o cancro da haste, cujo agente causal é o fungo *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (anamorfo - *Phomopsis phaseoli* f. sp. *meridionalis*) Yorinori et al. (1993), embora resultados de pesquisa tenham demonstrado que a sua transmissão via sementes seja relativamente baixa (Sinclair e Backman, 1989; Yorinori, 1990; Garrido, 1994). A sua incidência e os níveis de danos estão relacionados com condições climáticas favoráveis (alta umidade), suscetibilidade de cultivares, potencial de inóculo do fungo na semente e/ou nos restos de cultura da safra anterior (Yorinori, 1990). Sob este aspecto, é que reside a importância da utilização de sementes sadias e/ou tratadas visando a prevenção ou redução das perdas na produção.

Um aspecto de grande relevância para o controle preventivo do cancro da haste, em soja, é o diagnóstico de seu agente causal em sementes. Neste sentido, o método empregado em análise de rotina para sementes de soja consiste na incubação em papel de filtro (“Blotter test”). Entretanto, a sua aplicação com o objetivo de detectar e identificar o agente do cancro da haste não tem alcançado resultados satisfatórios, uma vez que este patógeno pertence a um complexo fúngico denominado *Diaporthe/Phomopsis*, cujas espécies apresentam características culturais e morfológicas muito semelhantes e de difícil diferenciação.

A grande diversidade climática, existente nas regiões de cultivo da cultura da soja no Brasil e a alta variabilidade genética apresentada pelo patógeno, com possibilidades de desenvolver novas raças, sugerem que a ocorrência e severidade da doença podem variar de um ciclo para outro, e de região para região. Entretanto, poucos trabalhos registram informações acerca da relação do patógeno com sementes, e principalmente, a diferenciação desse organismo em teste de sanidade em laboratório, em relação aos demais componentes do complexo fúngico ao qual pertence.

Quanto ao aspecto do controle do cancro da haste, tem sido recomendado pela pesquisa a utilização de cultivares resistentes, associada ao tratamento de sementes, além de outras técnicas de manejo (Yorinori et al., 1993).

Considerando a grande importância de se buscar medidas alternativas de controle, a utilização de bioprotetores tem sido uma das maneiras mais atrativas, sendo estes empregados através da microbiolização de sementes, e esta tem sido considerada de grande potencial na introdução de antagonistas para controle de doenças de plantas (Luz, 1993).

Diante da necessidade da utilização de uma metodologia aplicável em trabalhos de rotina em laboratórios de Patologia de Sementes, para a detecção e identificação do agente causal do cancro da haste, e da busca de informações relacionadas ao controle biológico deste agente, procurou-se neste trabalho avaliar a viabilidade do emprego do método de blotter e ágar em placa (BDA acidificado) como padrão para detectar e identificar o agente do cancro da haste, e avaliar o efeito antagônico do fungo *Penicillium aurantiogriseum* sobre o crescimento micelial de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* "in vitro".

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Teste de sanidade para detecção de fungos em sementes de soja.

Em função das condições climáticas, da suscetibilidade varietal, das práticas culturais, várias são as doenças que podem ocorrer na cultura da soja, e sua importância decorre dos prejuízos que podem causar, reduzindo o rendimento e a qualidade da produção.

Inúmeros microorganismos têm sido identificados em sementes de soja, sendo que muitos podem ser transportados e/ou transmitidos por estas. Entretanto, alguns são mencionados com destaque por serem economicamente importantes como *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojina*, *Colletotrichum dematium* var. *truncata*, *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *sojae*, *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina*, *Peronospora manshurica*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, entre outros (Richardson, 1990).

Considerando a importância da associação de patógenos com sementes de soja, o teste de sanidade deve ser utilizado como medida necessária e preventiva para fornecer informações confiáveis com respeito à qualidade sanitária das sementes.

Uma diversidade de testes está disponível para detecção de patógenos em sementes, sendo sua escolha dependente do tipo de microorganismo envolvido, das condições de laboratório disponíveis e da finalidade do teste (Neergaard, 1979).

Através do Manual de Testes de Sanidade de Sementes publicado pela ISTA (1981), percebe-se o grande número de metodologias recomendadas para diferentes patógenos em diversas culturas. A nível de Brasil, testes de sanidade para fungos estão descritos em um capítulo específico incluído nas Regras para análise de sementes (Brasil, 1992), o qual preconiza o método a ser utilizado, e lista os principais fungos que devem ser detectados para cada cultura.

Um exemplo de detecção de inóculo superficial em sementes de soja, é o método de lavagem dessas sementes, o qual é utilizado para detecção de *Peronospora manshurica*, pois este fungo não se desenvolve satisfatoriamente em testes de incubação (Machado, 1988).

Os testes recomendados em análise de rotina de sementes de soja empregam, de modo geral, a incubação de sementes, e dentre eles encontram-se o “Blotter test” e o método de ágar em placa. O “Blotter test”, em princípio, é uma combinação de câmara úmida com o teste de germinação de sementes; entretanto, um obstáculo encontrado na condução do mesmo refere-se à germinação rápida das sementes, o que dificulta a avaliação, assim como compromete a sua eficiência (Machado, 1988). Sendo assim, para inibir a germinação o método sofre variações, e em se tratando de sementes de dicotiledônea, a recomendação é a adição de 2,4-Diclorofenoxiacetato de sódio ao substrato.

A utilização de 2,4-D em teste de sanidade foi primeiramente proposta por Hagborg, Warner e Phillips (1950) para detecção de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijão incubadas em ágar, sendo recomendada a uma concentração de 50 ppm da formulação salina do referido produto.

Alguns estudos têm enfatizado os efeitos de 2,4-D sobre os fungos, e estes podem estar relacionados com a formulação e concentração do produto (Limonard, 1968); sendo citados o éster e o ácido como mais fungitóxicos que o sal. Altas concentrações deste produto o tornam nocivo (Maguire et al., 1978; Machado, 1980). Estas informações foram ratificadas por Bassey e Gabrielson (1983) que citam outros fatores como luz, umidade, temperatura, pré-tratamento sobre sementes também como determinantes capazes de influenciar em ensaios com 2,4-D em teste de sanidade de sementes e assim alterando a sua eficiência e sensibilidade.

Estudos desenvolvidos com *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* demonstraram que o crescimento micelial foi afetado na presença de 2,4-D em concentrações acima de 10 µg/ml, sendo que esta dosagem foi capaz de inibir o desenvolvimento de plântulas, o que não ocorreu com *Colletotrichum truncatum* que se mostrou insensível a concentrações de até 200 µg/ml, indicando um possível efeito estimulatório; somente na concentração de 500 µg/ml foi observado um efeito repressor (Machado, 1980).

Pesquisa realizada com sementes de algodão, demonstrou que 2,4-D na concentração de 10 µg/ml foi eficiente na inibição da germinação de sementes, e apresentou

pequeno efeito inibidor sobre colônias de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (Sobreira, 1988).

Román (1995) verificou uma redução no índice de recuperação de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* em sementes de soja, quando foi adicionado ao substrato o herbicida paraquat (1,5 %) para inibir a germinação das mesmas, em comparação ao teste de sanidade sem modificação.

Com base nesses resultados, e em estudos “in vitro” conduzidos por Machado (1980), infere-se que há uma sensibilidade diferencial entre os microorganismos na presença de 2,4-D e/ou herbicidas utilizados como inibidores da germinação de sementes.

Na incubação de sementes em meio, pode-se dispor de diversos tipos de meio de cultura, sendo os mais utilizados o BDA, a sua variação acidificada e extrato de malte. Este teste pode sofrer modificações tornando o meio mais seletivo para determinados microorganismos, a exemplo da adição de PCNB ao BDA para restringir o crescimento de *Macrophomina phaseolina*; a adição de Tergitol em meio ágar para detecção de *Diaporthe phaseolorum* e *Cercospora kikuchii* (ISTA, 1981).

2.2 Aspectos morfológicos, culturais e patológicos de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*.

A nomenclatura dos fungos que causam o cancro da haste e a deterioração de sementes de soja, está associada a uma série de estudos morfológicos.

O fungo conhecido como *Diaporthe phaseolorum* (Cke. & Ell) Sacc. recebeu várias denominações, tais como, *Diaporthe batatais* (Harter & Field) agente causal da seca da raiz de batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.); *Diaporthe sojæ* Lehman agente causal da seca da haste e da vagem de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e *Diaporthe phaseolorum* agente causal da seca da vagem de feijão lima (*Phaseolus lunatus* L.). Contudo, a similaridade existente entre os teleomorfos, indicando não haver diferenças morfológicas fundamentais, foi reconhecida por Wehmeyer (1933) citado por Morgan-Jones (1985), que reclassificou as entidades como duas variedades, *Diaporthe phaseolorum* var. *batatais* (Harter & Field) Wehmeyer e *Diaporthe phaseolorum* var. *sojæ* (Lehman) Wehmeyer.

Estudos preliminares realizados por Welch e Gilman (1948), mostraram algumas diferenças entre os patógenos, considerando-se grau de patogenicidade, homotalismo, formação de peritécio cespitoso, sendo reconhecidas portanto duas formas distintas, *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*, originada de peritécios individuais e forma heterotática e, *Diaporthe phaseolorum* var. *batatais*, originada de peritécio cespitoso e forma homotática. Novos estudos realizados por Athow e Caldwell (1954), com linhagens de *Diaporthe phaseolorum* var. *batatais* da soja e da batata doce, determinaram que o cancro da haste da soja não era causado por *Diaporthe phaseolorum* var. *batatais*, em função de diferenças morfológicas, culturais e de patogenicidade, sendo reconhecida uma nova variedade *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* Athow & Caldwell.

Segundo Hildebrand (1956) o processo de formação de peritécio cespitoso seria uma característica inconsistente no complexo de *Diaporthe* em soja. Embora o fungo tenha sido até então identificado em sua fase perfeita, Frosheiser (1957) relata a existência de sua fase imperfeita correspondendo ao gênero *Phomopsis*.

Na década de 1950, o cancro da haste tornou-se um sério problema no norte dos EUA, tendo sua importância reduzida com a substituição de cultivares suscetíveis por cultivares resistentes. Próxima à década de 1970 a doença foi encontrada no sul dos EUA e sua disseminação sendo muito rápida, tornou-se novamente um problema para a cultura (Morgan-Jones, 1989).

No caso do cancro da haste, duas entidades foram reconhecidas e diferenciadas por várias características. Uma desenvolvia-se na região norte e a outra foi predominante na região sul dos EUA. Os critérios para diferenciá-las incluíam morfologia da colônia, ocorrência de estromas, morfologia do peritécio, formação do conidioma, formato e tamanho do ascosporo e diferença na taxa de crescimento micelial (Morgan-Jones e Backman, 1984; Morgan-Jones, 1989, 1992; Mc Gee e Biddle, 1987). Higley e Tachibana (1987) demonstraram especialização fisiológica entre os isolados do norte e do sul, mostrando diferença quanto à patogenicidade, e com base nesta observação duas raças foram propostas. Hobbs e Phillips (1985) observaram diferenças de sintomas em plantas no campo, sugerindo a sintomatologia como critério de separação entre os isolados do norte e do sul.

Keeling (1984) comparando isolados de *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* de diferentes regiões edafoclimáticas nos EUA, verificou diferença quanto à patogenicidade, sobre várias cultivares de soja, sugerindo a presença de seis raças fisiológicas do patógeno, designando raças 1, 2, e 3 para isolados do sul e raças 4, 5 e 6 para isolados do norte. Em trabalhos posteriores, Keeling (1988) verificou novamente diferença quanto à patogenicidade e também quanto ao crescimento micelial "in vitro". Os isolados do norte, quando expostos à temperatura de 30°C apresentaram uma redução no crescimento micelial e foram não patogênicos, ao contrário do isolados do sul cuja temperatura não afetou o crescimento, e a patogenicidade foi mantida no intervalo entre 21°C e 30°C, sendo considerados mais tolerantes ao calor. O acúmulo de evidências em tal trabalho sugere diferenças entre os isolados.

Com base nas evidências apresentadas com respeito a diferenças fisiológicas e morfológicas entre os isolados, Morgan-Jones (1989) propôs a separação das entidades em formas especiais, sendo assim, o isolado do sul foi denominado de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (Morgan-Jones, 1989) anamorfo - *Phomopsis phaseoli* f. sp. *meridionalis*, e o isolado do norte denominado de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *caulivora*.

No Brasil, o cancro da haste foi identificado pela primeira vez na safra 1988/89 no sul do Estado do Paraná e em áreas do município de Rondonópolis - MT (Yorinori et al., 1989). Na safra de 1989/90 foi encontrado em todas as regiões produtoras de soja do país. O patógeno foi identificado como sendo o mesmo que causa o cancro da haste no sul dos EUA (Yorinori, 1990).

O gênero *Diaporthe* é pertencente à classe Pyrenomycetes da subdivisão Ascomycotina, e seu anamorfo *Phomopsis* está classificado na classe Coelomycetes da subdivisão Deuteromycotina (Ainsworth, 1973).

Os sintomas iniciais do cancro da haste em soja são caracterizados por pontos negros a castanho avermelhados, podendo ser observados 15 a 20 dias após a infecção. Estes pontos escuros evoluem para manchas elípticas a alongadas, com centros negros e margens mais claras; as manchas podem progredir e são unilaterais, adquirindo uma coloração castanho avermelhada. Nesta fase o aspecto da mancha é característico de cancro e pode ser verificado cerca de 50 a 80 dias após a infecção. As necroses são vistas com maior frequência nos pontos de inserção dos ramos laterais e dos pecíolos e em seguida no entrenós e nas folhas.

Um sintoma marcante no diagnóstico da doença é o escurecimento da medula, e o aparecimento de plantas com folhas amareladas e com necrose entre as nervuras (folha carijó) (Backman, Weaver e Morgan-Jones, 1985; Backman, McGee e Morgan-Jones, 1989; Damicone, Snow e Berggren, 1990; Yorinori, 1990).

A infecção de uma safra para outra ocorre através de ascosporos liberados dos peritécios, formados nos fragmentos e resíduos de soja da safra anterior, e que são disseminados pela chuva, vento, equipamentos, etc., sendo depositados sobre órgãos de plantas, e através de conídios liberados dos picnídios, dentro da mesma safra (Backman, Weaver e Morgan-Jones, 1985; Yorinori, 1990). Alguns fatores estão relacionados com o processo de infecção de tal doença, influenciando o desenvolvimento de peritécios, produção de ascosporos e sua dispersão.

Smith, Backman e Crawford (1986) estudando a epidemiologia de *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, observaram que infecções precoces resultam em uma alta incidência da doença, enquanto que, em infecções tardias ocorrendo ao final do estágio vegetativo e início da fase reprodutiva, os sintomas da doença poderão não ser reproduzidos, sendo essa observação também válida para *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (Yorinori, 1990). Os primeiros autores citam que um aumento na severidade da doença ocorre quando as plantas sofrem estresses hídricos ou seca, ataque de insetos e/ou nematóides.

Ploetz e Shokes (1986, 1987a, 1987b) conduzindo vários estudos com respeito à epidemiologia do cancro da haste, verificaram que a melhor temperatura para a ocorrência da infecção está entre 28°C e 34°C, em condições de alta umidade por 48 horas, e que a frequência de infecção e densidade do inóculo apresentavam uma correlação positiva. Observaram também, que a base do pecíolo e haste têm um importante papel para a infecção e o desenvolvimento dos sintomas da doença.

Subbarao et al. (1992) observaram que a umidade do solo é um fator relevante na formação de peritécio, sendo que, após a produção de ascosporos, baixas condições de umidade podem prolongar a viabilidade do inóculo primário.

Estudos conduzidos por diversos pesquisadores, tais como Damicone, Berggren e Snow (1988); Damicone, Snow e Berggren (1990); Keeling (1990), sobre a disseminação do cancro do haste têm demonstrado, por um lado, que o cancro da haste em soja sofre grande

influência do ambiente, cultivar, chuva e ventos, sendo que, a dispersão do inóculo ocorre próximo à fonte, em todas as direções, num espaço aproximado de dois metros.

Em termos de gama de hospedeiros, Frosheiser (1957) estudando o comportamento de outras espécies de leguminosas diante de *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, através de inoculação artificial em casa de vegetação relatou que, embora o fungo tenha sido reisolado das hastes de todas as espécies inoculadas, os sintomas típicos do cancro, foram vistos apenas sobre hastes de plantas de feijão, alfafa, trevo vermelho e soja, evidenciando a possibilidade destas espécies tornarem-se naturalmente infectadas, e atuarem como fonte de inóculo e/ou hospedeiras alternativas do patógeno.

Roy e Miller (1983) também identificaram o algodão como possível hospedeiro do agente do cancro da haste, quando isolados do patógeno obtidos de folhas e hipocótilos de algodão, mostraram sua patogenicidade ao serem inoculados em hastes de plantas de soja.

Lee e Subbarao (1993) ao verificarem a capacidade de sobrevivência de *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* em diferentes substratos, sejam estes hospedeiros, não hospedeiros e abióticos, concluíram que o mesmo pode sobreviver como saprófita, sobre plantas não cultiváveis crescidas ao redor dos campos de soja, sobre fragmentos de plantas de trigo além daqueles de plantas de soja.

A grande variabilidade patogênica entre isolados de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, além de diferenças na taxa de crescimento micelial "in vitro", características culturais e morfológicas têm sido evidenciadas por vários autores (Higley e Tachibana, 1987; Mc Gee e Biddle, 1987; Keeling, 1988; Morgan-Jones, 1985, 1989).

Pacumbaba (1988) verificou variações morfológicas e culturais de diferentes isolados de *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, oriundos de regiões distintas do sul dos EUA, quando cultivados em meio BDA, incluindo entre elas, taxa de crescimento micelial, número de estromas produzidos, coloração e consistência da colônia quando submetidas a diferentes pH, temperatura e luminosidade, concluindo que o meio com pH 4,5 a 20°C em luz fluorescente contínua proporcionava o máximo de crescimento micelial para aqueles isolados, e em meio com pH 5,5 a 15°C ocorria uma maior produção de estromas, tanto em luz contínua quanto no escuro. Entretanto, Román e Ribeiro (1994) ao estudarem as características de nove isolados de

Os peritécios são esféricos, longos, pescoço afilado, normalmente são solitários, sem ornamentação. Ascospores são alongados e clavados. Os ascospores são similares quanto à forma ao conídio alfa (fusiforme-elíptico) mas são largos, bicelulares e bigutulados em ambas as células.

Isolados de *Phomopsis longicolla* apresentam colônias densas, floculosas e brancas, desenvolvendo áreas amarelo-esverdeadas com a idade. No verso as colônias apresentam-se descoloridas com estromas pretos e espalhados. Picnídios são pretos, estromáticos solitários ou agregados, uni ou multilocular, com pescoço proeminente, longo com mais de 200 µm. Conídios alfa são hialinos, elipsóides a fusiformes e gutulados. Conídios beta raramente são formados.

Os isolados de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* apresentam culturas brancas a creme-pêssego e uniformes. Há formação de clamidospores que dão uma coloração específica à colônia em tons de canela a laranja-amarelado, com desenvolvimento de micélio aéreo tornando-se posteriormente algodinoso (oprimido). Os estromas são irregulares na forma, variando de 2 a 10 mm no diâmetro, ocasionalmente fundem-se para formar um estroma mais amplo. Os peritécios apresentam pescoços mais largos e longos e são mais vigorosos, apresentam-se solitários e eventualmente espalhados. Os ascospores são hialinos, alongados, elipsoidais, bicelulares com septo constricto. Estes autores relatam a produção de apenas conídios alfa. Entretanto, Román (1995) cita a presença de conídio beta em um dos isolados estudados em seu trabalho de caracterização “in vitro”.

O cancro da haste é uma doença capaz de causar morte prematura de 100 % das plantas em lavouras de soja (Backman, McGee e Morgan-Jones 1989); Yorinori (1990).

Trata-se de uma doença que segundo vários trabalhos desenvolvidos ao longo dos anos, apresenta uma baixa transmissão de seu agente via semente. Backman, Weaver e Morgan-Jones (1985); Backman, McGee e Morgan-Jones (1989) citam que em seus estudos o nível de infecção de sementes com *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* foi menor que 5 % em regiões no sul dos EUA.

Yorinori (1992); Jaccoud F^o e Reeves (1993) relatam que o nível de infecção de sementes pelo agente do cancro da haste têm sido normalmente menor que 1%, contudo, retratam as sementes como o meio mais efetivo de disseminação a longas distâncias, concordando com

relatos de McGee (1983), Ploetz e Shokes (1986, 1987a, 1987b). Estudos sobre a transmissão do agente do cancro da haste da planta à semente realizados por Garrido (1994) e Román (1995) indicaram que a porcentagem de sementes infectadas com *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* permaneceu abaixo de 3% e 2% respectivamente.

Todos os membros do complexo *Diaporthe/Phomopsis* podem se associar à sementes de soja, podendo afetar a qualidade do produto, assim como reduzir a germinação das sementes (Hildebrand, 1956; Wallen e Seaman, 1962; Kemptz, Schmitthenner e Ellett, 1978; Omer, Sapra e Pacumbaba, 1988; Sinclair, 1993).

Visto ser um agente de difícil detecção na semente e podendo inclusive ser confundido com os demais agentes do complexo *Diaporthe/Phomopsis*, estudos preliminares de Yorinori (1991a, 1991b, 1992) indicaram a remota possibilidade de se detectar esse agente em sementes, através do método de incubação em papel de filtro "Blotter test". A grande variabilidade morfológica entre os componentes do referido complexo, principalmente com respeito à variação na coloração do micélio em diferentes sementes, e variação dos picnídios, faz com que a distinção desses fungos seja extremamente dificultada.

Jaccoud F^o. e Reeves (1993) considerando as similaridades existentes entre membros do complexo *Diaporthe/Phomopsis* e as dificuldades em se distinguir organismos mais virulentos de espécies menos virulentas, conduziram estudos utilizando técnicas moleculares como RAPD e PCR, no intuito de subsidiar futuros trabalhos de diagnose visando à detecção e identificação de *Phomopsis phaseoli* f. sp. *meridionalis* de sementes de soja. Embora os resultados desses estudos sejam bastantes promissores, é preciso que se considerem as suas limitações em termos de aplicação em análise de rotina.

2.3 Controle Biológico e Químico do cancro da haste de soja.

Para que ocorra o controle do cancro da haste é de fundamental importância que ocorra um trabalho multidisciplinar, integrando todas as medidas capazes de reduzir o potencial do inóculo do patógeno na lavoura (Yorinori et al. 1993).

A exemplo do que ocorre para inúmeras outras enfermidades, a utilização de cultivares resistentes é considerada a medida mais eficiente e econômica para o controle do

cancro da haste (Backman, Weaver e Morgan-Jones, 1985; Backman, McGee e Morgan-Jones 1989; Yorinori, 1990). Outras medidas de controle como, rotação de culturas; sucessão de culturas não suscetíveis; aração profunda com incorporação de restos culturais; semeadura em épocas de menor frequência de chuvas; adubação adequada, com ênfase ao potássio; tratamento de sementes com fungicidas, etc. devem ser consideradas em se tratando de doença da natureza e tipo do cancro da haste causado por *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (Yorinori, 1990, 1991a; Yorinori et al., 1993).

O tratamento químico das sementes é uma das medidas mais simples e seguras no controle de microorganismos transportados e/ou transmitidos pelas mesmas. Além de eliminar ou reduzir o inóculo do patógeno na semente, apresenta benefícios ao evitar a introdução de patógenos em áreas indenes, propiciar emergência uniforme de plantas, possibilitar o plantio em grandes áreas, proteger as sementes e plântulas contra os microorganismos presentes no solo, evitar o replantio com economia de sementes (Henning, França Neto e Costa, 1981; Nasser et al., 1984; Machado, 1986, 1988; Nunes Junior, 1986).

A recomendação de fungicidas no controle de fitopatógenos, é uma etapa que deve passar pela avaliação dos mesmos "in vitro", sendo este prognóstico de grande valor para estimar o comportamento de determinados patógenos, quando submetidos à ação de diferentes produtos fungitóxicos em condições de campo (Edington, Khew e Barron, 1971; Lima et al., 1975; Menten et al., 1976; Almeida e Yamashita, 1977; Bolkan, Silva e Cupertino 1976; Minussi, Bredemeier e Weber, 1979).

Em estudos voltados para soja, Freedman, Snow e Berggren (1987) verificaram a ação de benomyl e thiabendazol sobre o crescimento micelial e esporulação "in vitro", de isolados de *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* e observaram que houve uma considerável influência sobre estes fatores, conforme a concentração dos compostos.

A incorporação de fungicidas não sistêmicos (ou protetores), com amplo espectro de ação, como captan, maneb e thiram entre outros em sementes, é uma prática tradicional, visando proteger as plântulas contra patógenos das próprias sementes e presentes no solo (Sinclair, 1988).

Estudos conduzidos por Bolkan, Silva e Cupertino (1976) comparando o efeito de fungicida sistêmico e não sistêmico sobre a ocorrência de fungos de sementes de soja,

demonstraram que todos os produtos foram inibidores a *Phomopsis sp.*, sendo benomyl o mais eficaz reduzindo o tamanho das colônias e propiciando aumento da germinação “in vitro”, seguido de thiram. Entretanto, em algumas variedades benomyl mostrou-se fitotóxico ao reduzir a emergência no campo. Resultados positivos no controle de *Phomopsis phaseoli* em sementes de soja também foram verificados por Lasca et al. (1987) através de avaliações realizadas em laboratório, casa de vegetação e a campo. Vários produtos foram testados isoladamente e em mistura, e dentre eles, o thiram em ambas as condições mostrou-se eficiente, com bom desempenho no controle da doença. Por sua vez, as mesmas conclusões não foram verificadas por Henning, Krzyzanowski e França Neto (1991) em estudos envolvendo eficiência de vários fungicidas em sementes de soja. Resultados obtidos desse trabalho revelaram que fungicidas tradicionais, que na maioria das vezes apresentam excelente desempenho, como captan, thiram, carboxin + thiram não controlaram *Phomopsis sp.* em condições de campo.

Devido a importância apresentada pelo cancro da haste em sementes de soja e a importância do tratamento de sementes com fungicidas apropriados para seu controle, Henning (1994) conduziu um outro trabalho testando a eficácia de diferentes fungicidas e misturas no controle deste patógeno, e verificou que thiabendazol, thiabendazol + thiram, captan + thiabendazol e carbendazim erradicaram completamente o fungo das sementes.

Alternativamente ao tratamento químico, a eliminação ou redução do inóculo em sementes pode ser alcançada com eficiência através de vários métodos, entre eles o biológico, sendo a microbiolização de sementes uma estratégia considerada como vantajosa no controle integrado de doenças (Machado, 1988; Luz, 1993).

Luz (1991) cita a microbiolização de sementes como um meio eficaz de introduzir antagonistas, provavelmente porque são colocados num ambiente favorável, a espermosfera. Além de controlar patógenos na espermosfera, controla também patógenos que sobrevivem no solo.

Os bioprotetores utilizados na microbiolização de sementes se resumem de modo geral a poucos gêneros de bactérias, leveduras e fungos, principalmente os fungos filamentosos. Algumas citações evidenciam fungos dos gêneros *Chaetomium*, *Gliocladium*, *Penicillium* e *Trichoderma* como os mais promissores no controle de alguns fungos patogênicos (Tveit e

Moore, 1954; Tronsmo, 1978; Tu, 1980; Windels, 1981; Bell, Wells e Markham, 1982; Howell, 1987; Homechin, 1987; Illipront, Jr., 1991; Luz, 1991; Michereff, Menezes e Mariano, 1993).

No Brasil existem poucos trabalhos com tratamento biológico de sementes de soja; a maioria encontra-se ainda em fase preliminar como o trabalho de Neumaier, utilizando espécies de *Trichoderma* visando o controle de *Phomopsis sojae*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*, citado por Luz (1991).

Estudos de Homechin (1987) indicaram que alguns isolados de *Trichoderma harzianum* foram capazes de inibir alguns fungos como *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium rolfsii* e *Rhizoctonia solani* em meio de cultura, e *Rhizoctonia solani* em sementes de soja inoculadas artificialmente.

Outro exemplo de sucesso referido por Luz (1991) com sementes de trigo, é a ação antagônica de alguns agentes biológicos sobre patógenos causadores da podridão das raízes de trigo "in vitro", mostrando o controle dos patógenos em sementes, o aumento da germinação em laboratório e estande no campo.

Reis (1975) trabalhando com podridão da haste de soja causada por *Sclerotinia sclerotiorum*, verificou a ação antagônica de espécies de *Penicillium* e *Trichoderma* sobre estruturas de resistência do patógeno.

Nakamura et al. (1977) ao isolarem microorganismos antagônicos a *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* à partir de solos com e sem autoclavagem, verificaram que as espécies mais frequentemente isoladas pertenciam aos gêneros *Gliocladium*, *Penicillium* e *Trichoderma*. O estabelecimento de *Penicillium oxalicum* e *Trichoderma harzianum* na rizosfera foi observado entre 10 a 28 dias após a semeadura de sementes microbiolizadas (Kommedahl e Windels, 1978).

A ação de *Penicillium oxalicum* como antagonista em sementes de ervilhas e de grão de bico, protegendo as plântulas do tombamento em pré-emergência é também um exemplo clássico referido por diversos pesquisadores (Windels, 1981; Kaiser, 1984).

O controle de *Phomopsis* sp. por *Bacillus subtilis* em sementes de soja sob condições controladas, foi evidenciado em trabalho de Cubeta, Hartman e Sinclair (1985). Sob condições de campo tal efeito não foi observado.

O controle biológico, ao contrário do controle químico, não apresenta de modo geral efeito imediato. Deve-se também considerar que nem sempre o nível de controle obtido pelo método biológico isoladamente, é suficiente para que danos à produção sejam evitados (Bettiol e Ghini, 1995). Neste sentido a combinação de métodos químicos e biológicos, quando possível, surge como uma estratégia das mais eficazes no controle de inúmeras doenças.

Luz (1993); Bettiol e Ghini (1995) citam que a integração entre os fungicidas químicos com os bioprotetores pode trazer algumas vantagens, como aumento da amplitude de controle dos patógenos, ou a obtenção de um efeito aditivo ou uma ação sinérgica sobre determinado patógeno ou sobre um complexo de doenças, o que permitiria uma redução significativa da quantidade de pesticida necessária ao controle da doença.

O processo de integração entre o controle químico e biológico foi considerado como compatível por Lifshitz e Lifshitz (1985) ao verificarem uma ação aditiva entre o fungicida benodanil e o fungo *Trichoderma harzianum*, no processo de inibição do crescimento de *Rhizoctonia solani* "in vitro". Através de estudos realizados com thiram Richardson (1973) verificou que o mesmo não inibiu *Trichoderma viride* até a concentração de 6,2 ppm e *Penicillium* sobreviveu até a concentração de 50 ppm.

A combinação do fungicida metalaxil com agentes de controle biológico através da microbiolização de sementes de algodão é também um exemplo referido na literatura em que o tratamento com a mistura apresentou um efeito positivo no controle de *Pythium*. Resultado semelhante foi registrado por Mukhopadhyay, Shresthal e Mukherjee (1992) através do tratamento de sementes envolvendo *Gliocladium virens* e fungicida carboxin, no manejo de fungos como *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* em grão de bico, lentilha e amendoim.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINSWORTH, G.C.; SPARROW, F.K.; SUSSMAN, A.S. *The fungi. An Advanced Treatise*. London: Academic Press, v.4, 1973. 621p.
- ALMEIDA, A.A.R.; YAMASHITA, J. Avaliação da toxidez de fungicidas sobre patógenos de soja, in vitro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.2, n.3, p.211-215, out. 1977.

- ATHOW, K.L.; CALDWELL, R.M. A comparative study of *Diaporthe* stem canker and pod and stem blight of soybean. *Phytopathology*, Lancaster, v.44, n.6, p.319-325, 1954.
- BACKMAN, P.A.; MCGEE, D.C.; MORGAN-JONES, G. In: SINCLAIR, J.B.; BACKMAN, P.A. (eds.). *Compendium of soybean diseases*. 3.ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1989. p.41-43.
- BACKMAN, P.A.; WEAVER, D.B.; MORGAN-JONES, G. Soybean stem canker: an emerging disease problem. *Plant Disease*, St. Paul, v.69, n.8, p.641-647, Aug. 1985.
- BASSEY, E.O.; GABRIELSON, R.L. Factors affecting accuracy of 2,4-D assays of crucifer seed for *Alternaria brassicicola* and relation of assays to seedling disease potential. *Seed Science and Technology*, Zurich, v.11, n.2, p.411-420, 1983.
- BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHAM, C.R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, St. Paul, v.7, n.4, p.379-382, 1982.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN Fº, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. eds. *Manual de Fitopatologia*. 3.ed. São Paulo: AGRONÔMICA CERES, 1995. v.1, cap.36, p.717-728.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. *Regras para análise de sementes*. Brasília, 1992. 365p.
- BOLKAN, H.A.; SILVA, A.R.; CUPERTINO, F.P. Fungi associated with soybean and bean seeds and their control in central Brazil. *Plant Disease Reporter*, Beltsville, v.60, n.6, p.545-548, June 1976.
- CUBETA, M.A.; HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B. Interaction between *Bacillus subtilis* and fungi associated with soybean seeds. *Plant Disease*, St. Paul, v.69, n.6, p.506-509, June 1985.
- DAMICONE, J.P.; BERGGREN, G.T.; SNOW, J.P. Cultivar and environmental effects on spread of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* and soybean stem canker development. *Phytopathology*, St. Paul, v.78, n.12, p.1614-1615, 1988. (Abst.).
- DAMICONE, J.P.; SNOW, J.P.; BERGGREN, G.T. Spatial and temporal spread of soybean stem canker from an inoculum point source. *Phytopathology*, St. Paul, v.80, n.6, p.571-578, June 1990.
- EDGINGTON, L.V.; KHEN, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology*, St. Paul, v.61, n.1, p.42-44, Jan. 1971.

- FREEDMAN, J.A.; SNOW, J.P.; BERGGREN Jr., G. T. Response of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* to fungicides: an in vitro study. *Phytopathology*, St. Paul, v.77, n.12, p.1770, Dec. 1987. (Abst.).
- FROSHEISER, F.I. Studies on the etiology and epidemiology of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, the cause of stem canker of soybean. *Phytopathology*, Baltimore, v.47, p.87-94, Fev. 1957.
- GARRIDO, L.R. Cancro da haste: Inóculo primário de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* e reação de plantas de soja à inoculação do patógeno. Viçosa: UFV, 1994. 73p. (Tese - Mestrado em Fitopatologia).
- HAGBORG, W.A.F.; WARNER, G.M.; PHILLIPS, N.A. Use of 2,4-D as an inhibitor of germination in routine examinations of beans for seed-borne infection. *Science*, Washington, v.11, n.2874, p.91, Jan. 1950.
- HENNING, A.A. Controle químico de *Colletotrichum truncatum* e *Phomopsis* sp. em sementes de soja. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.19, p.328, 1994. (Resumo).
- HENNING, A.A.; FRANÇA NETO, J.B.; COSTA, N.P. **Recomendações do tratamento químico de sementes de soja [*Glycine max* (L.)Merrill]**. Londrina: EMBRAPA-CNPQSO, 1981. 9p. (Comunicado Técnico, 12).
- HENNING, A.A.; KRZYKANOWISK, F. C.; FRANÇA NETO, J.B. Eficácia do tratamento de sementes de soja com fungicidas no controle dos principais fungos fitopatogênicos transmitidos pela semente. *Informativo ABRATES*, v.1, n.4, p.68, set. 1991.
- HIGLEY, P.M.; TACHIBANA, H. Physiologic specialization of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* in soybean. *Plant Disease*, St.Paul, v.71, n.9, p.815-817, Sept. 1987.
- HILDEBRAND, A.A. Observations on stem canker and pod and stem blight of soybean in Ontário. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.34, p.577-599, 1956.
- HOBBS, T.W.; PHILLIPS, D.V. Identification of *Diaporthe* and *Phomopsis* isolates from soybean. *Phytopathology*, St. Paul, v.75, n.4, p.500, Apr. 1985.
- HOMECHIN, M. **Potencial e emprego de isolados brasileiros de *Trichoderma harzianum*, Rifai, para controle de patógenos de soja [*Glycine max*.(L.) Merrill]**. Piracicaba: ESALQ, 1987. 186p. (Tese - Doutorado em Fitopatologia).
- HOWELL, C.R. Relevance of mycoparasitism in the biological control of *Rhizoctonia solani* by *Gliocladium virens*. *Phytopathology*, St. Paul, v.77, n.7, p.992-994, 1987.

- ILLIPRONTI Jr, R.A. Efeitos antagônicos de fungos procedentes da região do Alto Paranaíba - MG, em relação a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, em soja [*Glycine max* (L.) Merrill] e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Lavras: ESAL, 1991. 70p. (Tese - Mestrado em Fitossanidade).
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Handbook on seed health testing**: Zurich, 1981. n.p. (Waking sheets section 2).
- JACCOUD F^o, D.S.; REEVES, J.C. Detection and identification of *Phomopsis* species in soya bean seeds using PCR. In: SYMPOSIUM ON SEED HEALTH TESTING, 1., Ottawa, 1993. **Proceedings...** Ottawa: ISTA, 1993. p.34-43.
- KAISER, W.J. Biological control of seed rot and preemergence damping-off of *Chickpea* with *Penicillium oxalicum*. **Plant Disease**, St. Paul, v.68, n.9, p.806-811, 1984.
- KEELING, B.L. Influence of temperature on growth and pathogenicity of geographic isolates of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. **Plant Disease**, St. Paul, v.72, n.3, p.220-222, Mar. 1988.
- KEELING, B.L. Measurement of relative resistance of soybean cultivars to stem canker. **Phytopathology**, St. Paul, v.74, p.819, 1984. (Abst.).
- KEELING, B.L. Observed spread of soybean stem canker disease. **Phytopathology**, St. Paul, v.80, n.10, p.1004, 1990. (Abst.).
- KEMTZ, K.T.; SCHMITTHENNER, A.F.; ELLETT, C.W. Soybean seed decay: Prevalence of infection and symptom expression caused by *Phomopsis* sp.; *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*, and *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. **Phytopathology**, St. Paul, v.68, p.836-840, June 1978.
- KOMMEDAHL, T.; WINDELS, C.E. Evaluation of biological seed treatment for controlling root diseases of pea. **Phytopathology**, St. Paul, v.68, n.7, p.1087-1095, July 1978.
- LASCA, C.C.; VALARINI, P.J.; SCHMIDT, J.R.; VECHIATO, M. H.; CHIBA, S. Tratamento de sementes de soja (*Glycine max*. (L.)Merril) com fungicidas visando controle de *Phomopsis phaseoli* (Desm.) Sacc. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.13, p.223-233, jul./dez. 1987.
- LEE, Y.; SUBBARAO, K.V. Saprotrophic ability of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* on host and non-host plants, and on abiotics substrates. **Mycological Research**, New York, v.97, p.7, p.782-784, July 1993.
- LIFSHITZ, R.; LIFSHITZ, S. Decrease in incidence of *Rhizoctonia* preemergence damping-off by use of integrated chemical and biological controls. **Plant Disease**, St. Paul, v.69, n.5, p.431-433, May 1985.

- LIMA, J.A.A.; MENEZES, M.; KARAM, M.Q.; OLIVEIRA, V.P.; RODRIGUES, M.G. Ação tóxica de alguns fungicidas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ, agente da antracnose do cajueiro. *Fitossanidade*, Fortaleza, v.1, n.2, p.62-66, jul. 1975.
- LIMONARD, T. Ecological aspects of seed health testing. *Proceedings of the International Seed Testing Association*, Wageningen, v.33, n.3, 167p. 1968.
- LUIZ, S.M.; YORINORI, J.T.; MEIRELLES, L.D.P. Condição nuclear em isolados de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* e *Phomopsis phaseoli* f. sp. *meridionalis*. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, v.17, n.3, p.221, Sept. 1994.
- LUZ, W. C. Controle biológico das doenças na espermosfera. In: BETTIOL, W. (org.). *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p.25-31.
- LUZ, W.C. Microbiolização das sementes para o controle das doenças das plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v.1, p.38-77, 1993.
- McGEE, D.C. Epidemiology of soybean seed decay by *Phomopsis* and *Diaporthe* spp. *Seed Science and Technology*, Zurich, v.11, p.719-729, 1983.
- McGEE, D.C. ; BIDDLE, J.A. Seedborne *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* in Iowa and its relationship to soybean stem canker in the southern United States. *Plant Disease*, St. Paul, v.71, n.1, p.620-622, 1987.
- MACHADO, J. C. *Patologia de Sementes - Fundamentos e aplicações*. Lavras: ESAL/FAEPE, 1988. 107p.
- MACHADO, J.C. *Studies on some seed-borne diseases of Zinnia, African Marigold and Soybean*. Manchester: University of Manchester, 1980. 187p. (Tese - PHD).
- MACHADO, J.C. Tratamento de sementes de feijão. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 2., Campinas, 1986. *Anais...* Campinas: Fundação Cargill, 1986. p.131-137.
- MAGUIRE, J.D.; GABRIELSON, R.L.; MULANAX, M.W.; RUSSEL, T.S. Factors affecting the sensitivity of 2,4-D assays of crucifer seed for *Phoma lingam*. *Seed Science and Technology*, Zurich, v.6, n.4, p.915-924, 1978.
- MENTEN, J.O.M. Prejuízos causados por patógenos associados às sementes. In: *Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico*. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 1991. p.115-135. (Anais da 2ª Semana de Atualização em Patologia de Sementes, Piracicaba, 1991).

- MICHEREFF, S.J.; MENEZES, M.; MARIANO, R.L.R. Antagonismo de espécies de *Trichoderma* sobre *Colletotrichum graminicola*, agente da antracnose do sorgo em condições de laboratório. *Summa Phytopathologica*, Jaguariúna, v.19, n.1, p.14-17, jan./mar. 1993.
- MINUSSI, E.; BREDEMEIER, F.D.; WEBER, L.F. Efeito fungitóxico in vitro de alguns fungicidas sobre o crescimento micelial de *Helminthosporium sativum* PAM.KING & BAKKE. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.4, n.3, p.487-491, out. 1979.
- MORGAN-JONES, G. The *Diaporthe/Phomopsis* complex of soybean: Morphology. In: **Proceedings of the conference on *Diaporthe/Phomopsis* diseases complex on soybean.** 1984. Agric. Res. Serv. United States Department of Agriculture. p.1-7. 1985.
- MORGAN-JONES, G. The *Diaporthe/Phomopsis* complex: Taxonomic considerations. In: **WORD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 4.** Buenos Aires, 1989. **Proceedings...** Buenos Aires: Asociacion Argentina de la soya, 1989. v.4, p.1699-1706.
- MORGAN-JONES, G. The *Diaporthe phaseolorum* complex of soybean. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.17, n.4, p.359-367, dez. 1992.
- MORGAN-JONES, G.; BACKMAN, P.A. Characterization of southeastern biotypes of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, the causal organism of soybean stem canker. *Phytopathology*, St. Paul, v.74, n.7, p.815, 1984. (Abst.).
- MUKHOPADHYAY, A.N.; SHRESTHA, S.M.; MUKHERJEE, P.K. Biological seed treatment for control of soil-borne plant pathogens. *Plant Protection Bulletin*, Rome, v.40, n.1/2, p.21-30, 1992.
- NAKAMURA, K.; BALMER, E.; CARDOSO, E.J.B.N.; NAKAMURA, A.M. Microorganismos antagônicos a *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (ATK.) SNYDER & HANSEN em alguns solos do Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v.3, n.2, p.124-130, abr./jun. 1977.
- NASSER, L.C.B.; ANJOS, J.R.N. dos.; PERES, J.R.R.; MEDEIROS, A.C.S.; SPEHAR, C.R.; URBEN, F., G.; SOUZA, P.I.M.de. **Fungicidas para tratamento de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill).** Brasília: EMBRAPA-CPAC, 1984. 6p. (Comunicado Técnico, 40).
- NEERGAARD, P. **Seed Pathology.** London: McMillan Press, 1979. v.1, 839p.
- NUNES Jr, J. Tratamento de sementes de soja. In: **SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 2.,** Campinas, 1986. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1986. p.149-159.

- OMER, M.A.; SAPRA, V.T.; PACUMBABA, R.P. Relationship between stem canker incidence and agronomic performance of soybean at different dates of planting. *Phytopathology*, St. Paul, v.78, n.12, p.1563, 1988. (Abst.).
- PACUMBABA, R.P. Variation in structure, growth and pathogenicity of stem canker pathogen from the southeastern United States. *Phytopathology*, St. Paul, v.78, n.5, p.629, 1988. (Abst.).
- PLOETZ, R.C.; SHOKES, F.M. Factors influencing infection of soybean seedlings by southern *Diaporthe phaseolorum*. *Phytopathology*, St. Paul, v.77, n.6, p.786-790, June 1987a.
- PLOETZ, R.C.; SHOKES, F.M. Infection of different plant parts of soybean seedlings by southern *Diaporthe phaseolorum* and its role in the development of stem canker symptoms. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.65, n.10, p.2104-2108, Oct. 1987b.
- PLOETZ, R.C.; SHOKES, F.M. Influence of temperature, inoculum density, and cultivar susceptibility on the infection of soybean seedlings by southern *Diaporthe phaseolorum*. *Phytopathology*, St. Paul, v.76, n.10, p.1082, Oct. 1986. (Abst.).
- PLOETZ, R.C.; SHOKES, F. M. Variability among of *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* in different vegetative compatibility groups. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.6, n.9, p.2751-2755, Sept. 1989.
- REIS, E.M. A podridão da haste da soja. *Lavoura Arrozeira*, Porto Alegre, n.287, p.32-36, set./out. 1975.
- RICHARDSON, M.J. **An annotated list of seed-borne diseases.** Zurich: The International Seed Testing Association, 1990. n.p.
- RICHARDSON, L.T. Synergism between chloroneb and thiram applied to peas to control seed rot and damping-off by *Pythium ultimum*. *Plant Disease Reporter*, Beltsville, v.57, n.1, p.3-4, Jan. 1973.
- ROMÁN, N.R.L. ***Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*: Caracterização de isolados, avaliação e detecção de fontes de resistência e transmissão por sementes em soja (*Glycine max.*(L.) Merrill).** Brasília: UNB, 1995. 96p. (Tese - Mestrado em Fitopatologia).
- ROMÁN, N.R.L.; RIBEIRO, W.R.C. Efeito de temperatura e luz no crescimento micelial de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.19, p.332, ago. 1994. (Resumo).
- ROY, K.W.; MILLER, W.A. Stem canker of soybean incited by isolates of *Diaporthe* and *Phomopsis* from cotton. *Phytopathology*, St. Paul, v.72, p.360, 1983.

- SCHMITTHENNER, A.F. Pod and stem blight and Phomopsis seed decay. In: SINCLAIR, J.B.; BACKMAN, P.A. (eds.). **Compendium of soybean diseases**. 3.ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1989. p.38-41.
- SINCLAIR, J.B. Evaluation of the use of chemicals as seed treatments. In: NASSER, L.C.B.; WETZEL, M.M.; FERNANDES, J.M. (eds.). **ADVANCED INTERNATIONAL COURSE ON SEED PATHOLOGY**, Passo Fundo, 1987. **Proceedings...** Brasília:ABRATES, 1988. p.198-206.
- SINCLAIR, J.B. *Phomopsis* seed decay of soybeans - A prototype for studying seed disease. **Plant Disease**, St. Paul, v.77, n.4, p.329-334, Apr. 1993.
- SINCLAIR, J.B.; BACKMAN, P.A. **Compendium of soybean diseases**. 3.ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1989. 106p.
- SMITH, E.F.; BACKMAN, P.A.; CRAWFORD, M.A. Epidemiology of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* and stem canker development in southern soybeans. **Phytopathology**, St. Paul, v.76, n.10, , p.1094, Oct. 1986. (Abst.).
- SOBREIRA, D.G. **Qualidade fisiológica e detecção de fungos em alguns lotes de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) produzidas no Estado de Minas Gerais, safra 1985/86**. Lavras: ESAL, 1988. 70p. (Tese - Mestrado em Fitossanidade).
- SUBBARAO, K.V.; PADGETT, G.B.; GEAGHAN, J.P.; SNOW, J.P. Influence of soil moisture on formation of perithecia and pycnidia and spore release in *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. **Phytopathology**, St. Paul, v.82, n.4, p.440-446, 1992.
- TRONSMO, A. Effect of temperature on antagonistic properties of *Trichoderma* species. **Transactions British Micological Society**, London, v.71, n.3, p.469-474, Dec. 1978.
- TU, J.C. *Gliocladium virens*, a destructive mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, St. Paul, v.70, n.7, p.670-674, 1980.
- TVEIT, M.; MOORE, M.B. Isolates of *Chaetomium* that protect oats form *Helminthosporium victoriae*. **Phytopathology**, Baltimore, v.44, p.686-689, 1954.
- WALLEN, V.R.; SEAMAN, W.L. Seed infection of soybean by *Diaporthe phaseolorum* and its influence on host development. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.41, p.13-21, 1962.
- WELCH, A.W.; GILMAN, J.C. Hetero e Homo-thallic types of *Diaporthe* on soybeans. **Phytopathology**, Lancaster, v.38, p.628-637, 1948.
- WINDELS, C.E. Growth of *Penicillium oxalicum* as a biological seed treatment on pea seed in soil. **Phytopathology**, St. Paul, v.71, n.9, p.929-933, 1981.

- YORINORI, J.T. **Cancro da haste da soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1990. 7p. (Comunicado Técnico, 44).
- YORINORI, J.T. Detecção do agente causador do cancro da haste em sementes de soja. In: MENTEN, J.O.M. (ed.). **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 1991a. p.109-113. (Anais da 2ª Semana de Atualização em Patologia de Sementes, Piracicaba, 1991).
- YORINORI, J.T. Diferenciação entre o *Phomopsis* da queima da haste e da vagem e do cancro da haste em sementes de soja através do Blotter test. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.16, n.2, p.37, jun. 1991b. (Resumo).
- YORINORI, J.T. Identification of *Diaporthe phaseolorum* f. sp. soybean seed by the Blotter test. In: INTERNATIONAL SEED TESTING CONGRESS SYMPOSIUM, 23., Argentina, 1992. **Abstracts...** Argentina, 1992. p.107.
- YORINORI, J.T.; ALMEIDA, A.M.R.; HOMECHIN, M.; MIRANDA, L.C.; KIIHL, R.A.S.; POLA, J.N.; TAMIOZO, I.H. Epifítia do cancro da haste da soja nos municípios de Castro, Palmeira, Ponta-Grossa e Tibagi, no Paraná, e Rondonópolis no Mato Grosso na safra de 1988/89. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 5., Campo Grande, 1989. **Resumos...** Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1989. p.22-23.
- YORINORI, J.T.; CHARCHAR, M.J.A.; NASSER, L.C.B.; HENNING, A.A. Doenças da soja e seu controle. In: ARANTES, N.E.; SOUZA, P.I.M.de. (eds.). **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: POTAFOS, 1993. p.333-397. (Anais do Simpósio sobre Cultura da Soja nos Cerrados, Uberaba, 1992).

3 ASPECTOS CULTURAIS E PATOGÊNICOS DE ISOLADOS DE *Diaporthe phaseolorum f. sp. meridionalis* EM RELAÇÃO A OUTROS COMPONENTES DO COMPLEXO *Diaporthe/Phomopsis*.

RESUMO

Tendo em vista a necessidade de informações quanto aos aspectos relacionados à associação do fungo *Diaporthe phaseolorum f. sp. meridionalis* com a semente de soja, avaliou-se o desenvolvimento micelial do patógeno em diferentes substratos e meios de cultura, assim como a sua diferenciação com relação aos outros patógenos do complexo responsável pela biodeterioração de sementes de soja. Foi observado uma significativa sensibilidade do patógeno a concentrações de 2,4-Diclorofenoxiacetato de sódio acima de 5 ppm, quando adicionado ao papel de filtro. Verificou-se uma resposta variada entre os diferentes isolados em estudo, quanto ao crescimento micelial sobre os meios de cultura. O meio BDA com pH 4,5 à temperatura de 25°C e sob luz contínua, foi a condição mais favorável ao crescimento dos isolados.

Devido à grande variabilidade apresentada pelo agente do cancro da haste, houve dificuldades na sua detecção e diferenciação pelo método de incubação em papel de filtro "Blotter test", entretanto, através da utilização do método agarizado foi possível distingui-lo dos demais componentes do complexo *Diaporthe/Phomopsis*.

SUMMARY

MORPHOLOGICAL AND PATHOGENIC ASPECTS OF ISOLATES OF *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* IN RELATION TO OTHER MEMBERS OF THE *Diaporthe/Phomopsis* COMPLEX ASSOCIATED WITH SOYBEAN.

In view of the need of additional informations on the interaction of *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* with soybean seeds having in sight its differentiation during health testing, the present work was carried out looking at the micelial development of such fungous on different medium substrates and at different incubation conditions. The assay on effect of 2,4-D (sodium salt) on paper substrate, showed that concentrations of this chemical higher than 5 ppm affected significantly the mycelial growth. Fungous growth was higher on acidified PDA medium, incubation at 25°C under continuous light, compared with Czapek and soybean extract media. Colonies of *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* were possible to be distinguished only on acidified PDA medium, as it had been referred to in previous studies. Differential detection of *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* in the presence of other *Diaporthe/Phomopsis* species on soybean seeds, by the blotter test, was seen to be difficult and unreliable to be adopted in routine testing.

3.1 INTRODUÇÃO

O cancro da haste da soja (*Glycine max* (L.) Merrill), é ocasionado pelo fungo *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (Morgan-Jones, 1989), e é uma doença de recente introdução no país, sendo considerada atualmente uma das mais sérias e importantes doenças da referida cultura. O cancro da haste pode causar perdas no campo sobre cultivares suscetíveis, de até 100 % (Yorinori et al., 1993). Na safra de 1993/94, foi considerado o responsável por perdas econômicas estimadas em US\$ 200 milhões (Luiz, Yorinori e Meirelles, 1994).

O fungo *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* é um dos representantes do grupo que compõe o complexo *Diaporthe/Phomopsis*, juntamente com *Diaporthe phaseolorum*

sua detecção diferencial segura e rápida em análise de rotina. A comparação de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* com os demais membros do complexo *Diaporthe/Phomopsis* em soja, foi feita considerando-se alguns aspectos que normalmente interferem na condução dos testes de sanidade convencionais da soja.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Sementes e em casa de vegetação do Departamento de Fitossanidade da UFLA - Lavras - MG, no período de novembro de 1994 a maio de 1995. Para este estudo foram conduzidos ensaios em diferentes etapas.

Etapa 1. Efeito de 2,4-D sobre o crescimento micelial de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*.

3.2.1 Obtenção e cultivo de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*.

O isolado foi obtido de planta de soja cultivar FT Cristalina, com sintomas do cancro da haste na fase de maturação, oriunda de uma região de cultivo do município de Presidente Olegário - MG, safra 1993/94.

Após a obtenção da cultura pura do fungo, a mesma foi preservada em tubos de ensaio (Figueiredo e Pimentel, 1989), até a sua utilização por ocasião dos ensaios, quando foram repicadas para placas de petri contendo meio BDA e incubadas em regime luminoso de 12h luz/ 12h escuro e temperatura de $21(\pm 2)^{\circ}\text{C}$, por um período de 7 dias.

3.2.2 Condução do experimento .

Alíquotas de uma solução estoque de 2,4-D foram adicionadas ao meio BDA diluído (batata 200g, dextrose 20g, ágar 3g, água destilada 1000ml) de forma a se obterem substratos com concentrações de 0, 5 e 10 ppm do sal.

Para cada placa de petri de 9 cm de diâmetro, utilizaram-se 3 folhas de papel de filtro umedecidas em meio BDA diluído e esterilizado e à temperatura de 45°C aproximadamente. Posteriormente à distribuição dos papéis saturados com os substratos, nas devidas concentrações nas placas de petri, cada uma dessas foi inoculada em sua região central, com um disco de micélio de 5 mm de diâmetro retirado da periferia de uma cultura de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, com 7 dias de idade (descrito em 3.2.1).

As placas foram incubadas à temperatura de 21(±2)°C, em regime alternado 12h luz/ 12h escuro, sob luz negra fornecida por lâmpadas SILVÂNIA F30 colocadas a 40 cm acima das placas de petri.

O diâmetro do crescimento micelial das colônias foi medido 7 dias após a transferência, e posteriormente à coloração realizada segundo método descrito por Machado e Langerak (1993) modificado. A coloração do micélio foi realizada adicionando-se 5 ml da solução corante constituída de glicerol 5ml: álcool etílico 45ml: água destilada 200ml: azul de anilina 0,05g em cada placa. Após 2 minutos, as placas foram transferidas para um aparelho de microondas por mais 2 minutos. Em seguida, o excesso da solução corante foi retirado pela lavagem do substrato em álcool etílico 40 % e, logo após, as placas foram expostas à temperatura ambiente para o processo de secagem final.

Para este ensaio empregou-se o delineamento experimental de blocos casualizados com 3 tratamentos (0, 5 e 10 ppm) e 7 repetições, perfazendo um total de 21 parcelas. Cada parcela foi representada por uma placa de petri.

Etapa 2. Comparação de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* com os demais membros do complexo *Diaporthe/Phomopsis* quanto à patogenicidade e aspectos culturais.

3.2.3 Obtenção de isolados a partir de sementes de soja oriundas de diferentes localidades geográficas.

Para obtenção de diferentes isolados, foram analisadas sementes de 50 amostras procedentes de diferentes localidades do Estado de Minas Gerais e de outros Estados, através do teste padrão de sanidade de sementes modificado, conforme resultados verificados na etapa 1.

A amostra de trabalho foi representada por 200 sementes não desinfestadas, sendo estas distribuídas em placas de petri de 15 cm de diâmetro, esterilizadas contendo cada uma, 3 folhas de papel de filtro esterilizadas e umedecidas com solução de 2,4-D na concentração de 5 ppm. Em cada placa foram distribuídas 25 sementes. Após preparadas, parte das placas foi incubada à temperatura de $21(\pm 2)^{\circ}\text{C}$, num regime alternado de 12h luz/12h escuro sob luz negra fornecida por lâmpadas TOSHIBA 40W, e outra parte incubada em temperatura de $25(\pm 2)^{\circ}\text{C}$, sob regime de luz contínua, fornecida por lâmpadas PHILIPS 40W tipo luz do dia. Após decorridos 7 dias, procedeu-se à leitura das placas efetuando-se os isolamentos de *Phomopsis* spp.

Com base em observações visuais das colônias desenvolvidas sobre as sementes, e considerando-se a procedência das mesmas, foram selecionados 10 isolados diferentes para os estudos seguintes (Tabela 1).

TABELA 1 - Procedência e natureza do material utilizado para obtenção dos isolados.

Isolados	Fonte inóculo	Cultivar	Procedência
01	Sementes	Engopa 306	C. Grande - MS
02	Sementes	Kis 602	Faxinal -PR
03	Sementes	FT - Estrela	Patrocínio - MG
04	Sementes	IAC - 8	P. Olegário - MG
05	Sementes	IAC - 8	Patrocínio - MG
06	Sementes	IAC - 8	Patrocínio - MG
07	Sementes	IAC - 8	Patrocínio - MG
08	Sementes	IAC - 8	Lavras - MG
09	Sementes	FT - Cristalina	C. Grande - MS
10	Haste	FT - Cristalina	P. Olegário - MG

3.2.4 Patogenicidade dos isolados do complexo *Diaporthe/Phomopsis* à cultivar FT - Cristalina.

3.2.4.1 Preparo do inóculo.

Para este trabalho utilizou-se a técnica de palitos de madeira colonizados por micélio do fungo, descrita por Keeling (1982) e modificada por Yorinori (1991b,1994). Os palitos de madeira de 1,5 cm de comprimento foram afinados em uma das extremidades, fervidos em água destilada por 30 minutos, com pelo menos três trocas de água para eliminar possíveis agentes tóxicos e/ou inibidor fúngico e autoclavados a 120°C por 20 minutos. O fungo foi repicado para placa de petri contendo meio BDA e incubado a 25(±2)°C, no escuro. Após 4 - 5 dias de incubação, 5 - 6 discos (5 mm de diâmetro) do meio contendo micélio foram transferidos para outras placas contendo meio BDA, dispostos equidistantemente e aproximadamente 60 palitos de madeira de 1,5 cm de comprimento foram colocados verticalmente, com a extremidade afinada para fora do meio. Após 4 dias de incubação a 25(±2)°C no escuro, o inóculo encontrava-se pronto para ser utilizado.

3.2.4.2 Inoculação e condução do experimento.

Foram preparados vasos plásticos com capacidade de 3,0 litros esterilizados, que receberam um substrato preparado na proporção 2:1:1 de solo peneirado, esterco de curral curtido e peneirado e areia grossa, respectivamente. Após a mistura o substrato sofreu uma desinfestação com Brometo de Metila.

Em cada vaso foram semeadas 10 sementes de soja, e por ocasião do momento da inoculação realizou-se um desbaste, mantendo-se 5 plantas por vaso.

O palito com a extremidade colonizada pelo fungo foi inserido no hipocótilo, a 1-1,5 cm abaixo do cotilédone, em plântula com 10 dias da semeadura.

Posteriormente à inoculação as plântulas foram mantidas em câmaras úmidas por 72 horas. Uma umidade relativa próxima a 85 % foi mantida, pela irrigação diária dos vasos.

Após 20 dias da inoculação foi realizada a avaliação, determinando-se a incidência de plantas com sintomas de cancos e a severidade dos isolados.

No período que transcorreu da inoculação até a avaliação, a temperatura média na casa de vegetação foi de 28,9°C para a máxima e 16,7°C para mínima.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso com 10 tratamentos (9 isolados + testemunha) e 4 repetições para cada tratamento, sendo que cada repetição constou de 25 plantas, distribuídas em 5 vasos.

A avaliação de incidência foi realizada através da contagem de plantas com sintomas do cancro da haste. A severidade foi avaliada através de uma escala de notas (Weaver et al., 1988), variando de 1 a 5 conforme se segue:

- 1 = ausência de sintomas;
- 2 = manchas em torno do ferimento;
- 3 = lesão menor que 5 mm de extensão;
- 4 = lesão entre 5 e 20 mm de extensão ou plantas murchas;
- 5 = lesão maior que 20 mm de extensão ou plantas mortas.

Para registrar com certeza a severidade do cancro da haste, realizou-se a abertura da haste das plantas a partir do ponto de inserção dos palitos, verificando-se o escurecimento da medula e sua extensão. Em seguida a avaliação, separaram-se pedaços de hastes dos diferentes tratamentos que receberam uma assepsia em laboratório, e foram plaqueados em placas de petri de 90 mm de diâmetro contendo meio BDA pH 4,5, em seguida mantidos sob incubação à temperatura de 25(±2)°C em regime de luz contínua, fornecida por lâmpadas PHILIPS 40W tipo luz do dia. Tais condições, foram proporcionadas para que todos os isolados pudessem ter as mesmas oportunidades de expressarem suas características miceliais sobre o meio de cultura.

3.2.5 Caracterização cultural de diferentes isolados de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* em diferentes meios de cultura.

Para esta fase foram utilizados três meios de cultura: BDA acidificado, Farinha de soja e Czapek, cuja composição baseou-se em Tuite (1969).

A metodologia proposta por McGee (comunicação pessoal, 1994)^{*}, para diferenciação dos agentes do complexo *Diaporthe/Phomopsis*, baseia-se em aspectos morfológicos e culturais apresentados pelos mesmos, sobre a superfície de meio BDA - pH 4,5.

Para realização deste trabalho, repicaram-se os 10 isolados anteriormente selecionados para placa de petri de 9 mm de diâmetro contendo meio BDA e após 7 dias de incubação à temperatura de $21(\pm 2)^{\circ}\text{C}$, em regime alternado de 12h luz/12h escuro, sob luz negra fornecida por 3 lâmpadas TOSHIBA 40W os mesmos foram utilizados como fonte de inóculo.

Para cada isolado foram preparadas 8 placas de petri de 90 mm de diâmetro, cada uma recebendo um volume de 15 ml do meio BDA acidificado (50°C). Após a solidificação do meio, as placas foram inoculadas ao centro com 1 disco de ágar de 5 mm de diâmetro com micélio do fungo, obtido através de um furador de rolhas, retirado da periferia da colônia, com 7 dias de idade, e incubadas por um período de 14 dias.

Metade das placas foi incubada à temperatura de $21(\pm 2)^{\circ}\text{C}$, em regime alternado de 12h luz/12h escuro sob luz negra fornecida por 3 lâmpadas TOSHIBA 40W a 40 cm acima das placas, enquanto a outra metade foi incubada à temperatura de $25(\pm 2)^{\circ}\text{C}$, sob luz contínua, fornecida por 3 lâmpadas fluorescentes PHILIPS 40W tipo luz do dia a 40 cm acima das placas.

O desenvolvimento do fungo foi acompanhado, realizando-se leituras a intervalos de 24 horas, medindo-se dois diâmetros em posições ortogonais entre si na face inferior das placas, até que uma das placas (repetição) de cada um dos isolados apresentasse o maior diâmetro em cada meio.

A taxa de crescimento micelial expressa em mm/dia foi calculada considerando-se o intervalo de 24 horas em que ocorreu o maior valor de crescimento radial em cada meio (Lilly e Barnett, 1951).

^{*} Curso de detecção de patógenos em sementes (5th ISTA-PDC), Lavras - MG, 1994.

As características miceliais das colônias foram avaliadas considerando-se cor, tipo (aspectos de densidade e homogeneidade das hifas) e posição do micélio em relação ao substrato.

Para que houvesse uma padronização em se tratando de coloração das colônias, seguiu-se os padrões descritos de acordo com o sistema Munsell (1975) de notação de cores, procurando-se com esta medida relacionar os resultados com a descrição morfológica dos fungos.

O mesmo procedimento foi realizado para os demais meios de cultura (Farinha de soja e Czapek). O meio de Farinha de soja foi escolhido por ser a soja hospedeiro natural de *Diaporthe phaseolorum* f.sp. *meridionalis*; e o meio Czapek foi utilizado em função de apresentar a composição química conhecida e constante.

O delineamento utilizado foi de blocos casualizados em esquema fatorial ($10 \times 3 \times 2$), constando de 10 isolados, 3 meios de cultura e 2 temperaturas, totalizando 60 tratamentos, com 4 repetições por tratamento. Cada placa de petri consistiu em uma repetição.

Etapa 3. Avaliação do comportamento de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* e de *Phomopsis* sp. em sementes de soja, artificialmente inoculadas e em condições do teste de sanidade.

As sementes empregadas no processo de inoculação foram da cultivar FT - Cristalina, oriundas de Mato Grosso do Sul, safra 1993/94.

Os isolados de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (Dpm) e *Phomopsis* sp. (Ps) utilizados como inóculo, foram obtidos de haste de soja (FT - Cristalina) e de sementes (FT - Estrela), oriundas de Presidente Olegário - MG e Patrocínio - MG, respectivamente.

O inóculo foi obtido através do crescimento do fungo em meio BDA à temperatura de $25(\pm 2)^{\circ}\text{C}$, em regime de luz contínua fornecida por lâmpadas PHILIPS 40W tipo luz do dia, por um período de 7 dias.

O processo de inoculação consistiu na distribuição e manutenção das sementes sobre as colônias dos fungos em crescimento ativo sobre BDA, dispostas em uma única camada, ocupando toda a superfície das mesmas, durante diferentes períodos de tempo: 0 h (exposição momentânea da semente sobre o inóculo); 15 h; 24 h e 30 h. Todo o procedimento foi realizado

de forma semelhante para ambos os patógenos. Para a testemunha, as sementes foram colocadas sobre o meio de cultura BDA, sem o crescimento fúngico.

Após o período de incubação as sementes foram retiradas das placas e expostas sobre papel de filtro à temperatura ambiente de laboratório para secarem por um período de 24 horas. Posteriormente realizaram-se testes de sanidade, para se determinar a presença dos patógenos nas sementes.

3.2.6 Condução dos testes de sanidade.

a) Incubação em papel de filtro - “blotter test”.

Momentos antes da instalação do ensaio, a amostra de trabalho foi submetida a uma assepsia superficial com hipoclorito de sódio (NaClO) a 1 % durante 1 minuto, sofrendo 3 lavagens consecutivas com água destilada esterilizada, e posta a secar sobre papel de filtro em câmara de fluxo laminar.

Para cada tratamento foram utilizadas 200 sementes, sendo incubadas em placas de petri de 15 cm de diâmetro, contendo 3 folhas de papel de filtro esterilizadas e umedecidas com água destilada e esterilizada. Em cada placa foram distribuídas 25 sementes, totalizando 8 placas por tratamento. Metade das placas foi incubada à temperatura de $21(\pm 2)^{\circ}\text{C}$ em regime alternado de 12h luz/ 12h escuro, sob luz negra fornecida por lâmpadas TOSHIBA 40W, e a outra metade incubada à temperatura de $25(\pm 2)^{\circ}\text{C}$ em regime de luz contínua, fornecida por lâmpadas PHILIPS 40W tipo luz do dia, por um período de 7 dias.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso, constando de 5 tratamentos (0, 15, 24 e 30 horas de exposição + testemunha) com 4 repetições. Cada parcela foi representada por uma placa de petri contendo 25 sementes, sendo que, cada condição de incubação foi analisada individualmente. A análise estatística foi realizada transformando-se os dados de porcentagem por $\log(x + 10)$.

b) Incubação em meio BDA acidificado.

Para realização deste ensaio foram utilizadas 100 sementes por tratamento, que foram incubadas em placas de petri de 90 mm de diâmetro, contendo aproximadamente 20 ml de meio BDA pH 4,5 ajustado com ácido láctico. Em cada placa foram distribuídas 10 sementes inoculadas, totalizando 10 placas por tratamento. As sementes inoculadas receberam uma assepsia superficial com NaClO a 0,5 % por 1 minuto e posteriormente foram lavadas em água destilada e esterilizada.

A incubação transcorreu por um período de 14 dias, à temperatura de $25(\pm 2)^{\circ}\text{C}$ em regime de luz contínua, fornecida por lâmpadas PHILIPS 40W tipo luz do dia, conforme metodologia descrita por McGee (comunicação pessoal, 1994)*.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso, constando de 5 tratamentos (0, 15, 24 e 30 horas de exposição + testemunha) com 10 repetições. Cada parcela foi representada por uma placa de petri contendo 10 sementes.

3.2.7 Características fenotípicas dos patógenos sobre sementes inoculadas simultaneamente com *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* e com *Phomopsis* sp.

Na condução deste ensaio, seguiu-se a metodologia de inoculação descrita na etapa 3, utilizando-se o período de 24 h de exposição das sementes a *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* e a *Phomopsis* sp.

Duas amostras de 200 sementes foram utilizadas para a inoculação, sendo que uma foi exposta inicialmente à colônia micelial de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, e em seguida foi mantida em temperatura ambiente sobre papel de filtro para secagem por 24 h, sendo então exposta pelo mesmo período de tempo à colônia micelial de *Phomopsis* sp. A segunda amostra recebeu o mesmo procedimento, entretanto, a exposição inicial foi à colônia de *Phomopsis* sp. e em seguida à colônia de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*.

Realizada a inoculação das sementes com ambos os isolados, procedeu-se ao teste de sanidade (papel de filtro) para se determinar a incidência dos patógenos. Metade das placas

* Curso de detecção de patógenos em sementes (5th ISTA-PDC), Lavras - MG, 1994.

foi incubada à temperatura de $21(\pm 2)^{\circ}\text{C}$ em regime alternado de 12h luz/ 12h escuro, sob luz negra fornecida por lâmpadas TOSHIBA 40W, e a outra metade incubada à temperatura de $25(\pm 2)^{\circ}\text{C}$ em regime de luz contínua, fornecida por lâmpadas PHILIPS 40W tipo luz do dia, por um período de 7 dias.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Efeito de 2,4-D sobre o crescimento micelial de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*.

O efeito das diferentes concentrações do sal de 2,4-D sobre o crescimento micelial de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* sobre papel de filtro saturado com meio BDA a 0,3 % encontra-se na Figura 1.

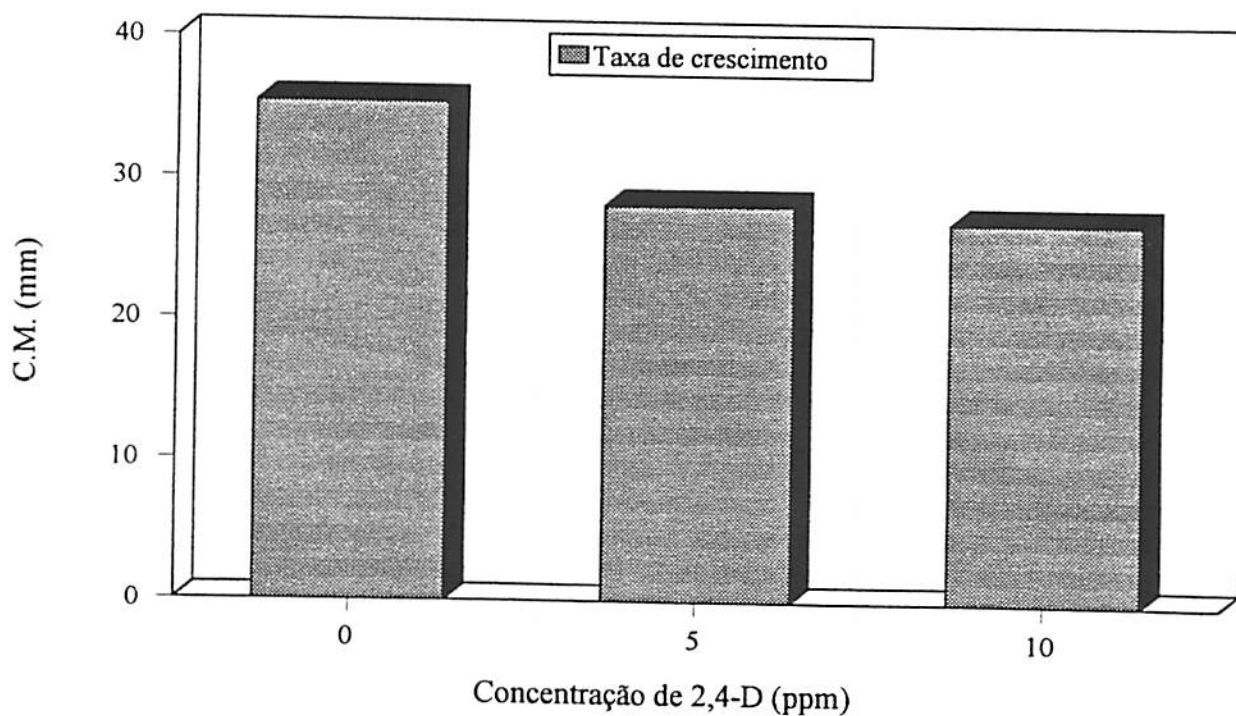


FIGURA 1. Efeito de 2,4-D sobre o crescimento micelial (CM) de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, sob temperatura de $21(\pm 2)^{\circ}\text{C}$. UFLA - Lavras, 1995.

Os resultados obtidos mostram uma sensibilidade do patógeno ao sal de 2,4-D adicionado ao substrato, quando comparado com a testemunha. Porém, os tratamentos referentes às concentrações de 5 e 10 ppm de 2,4-D não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ($P < 0,05$).

De certa forma resultados semelhantes foram encontrados por Machado e Langerak (1993) para alguns fungos associados a sementes de algodão, como *Colletotrichum gossypii*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *Botryodiplodia theobromae* e *Alternaria macrospora*. Tais fungos não apresentaram redução significativa do crescimento micelial quando cultivados sobre papel de filtro saturado com solução de 2,4-D (sal de sódio) entre 1,0 e 10 ppm.

Machado (1980) verificou uma significativa inibição do crescimento micelial de *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* em meio ágar contendo 2,4-D com concentrações a partir de 10 µg/ml. Esses resultados reafirmam de maneira clara os cuidados que devem ser tomados na utilização de 2,4-D, em testes de sanidade, posto que mesmo em doses relativamente baixas fungos importantes podem ter o seu desenvolvimento prejudicado, e às vezes totalmente inibidos na presença deste produto.

3.3.2 Comparação de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* com os demais membros do complexo *Diaporthe/Phomopsis* quanto a patogenicidade e aspectos culturais.

Os isolados obtidos através do teste de sanidade, foram agrupados de acordo com suas características comuns, considerando-se aquelas mais observadas em análise de rotina. De acordo com este procedimento obtiveram-se 9 (nove) grupos de isolados, sendo selecionado de cada um deles um isolado representativo. Estas características encontram-se descritas na Tabela 2.

3.3.2.1 Patogenicidade dos isolados do complexo *Diaporthe/Phomopsis* à cultivar FT - Cristalina.

Os resultados da avaliação de severidade dos isolados em plântulas desenvolvidas em casa de vegetação encontram-se dispostos na Tabela 3.

TABELA 2. Agrupamento dos isolados de *Phomopsis* spp. obtidos de sementes procedentes de diferentes regiões geográficas, através de incubação pelo teste padrão de sanidade "Blotter Test". UFLA - Lavras, 1995.

Características das colônias					Isolados	
MICÉLIO FLOCULOSO	Branco	Aéreo	Denso	Abundante	c/picnídios recobertos	5
			Ralo	Escasso	c/picnídios expostos (exudando)	1
		Baixo (superficial)	Denso	Abundante	c/picnídios expostos	2
	Branco a Pardo Escuro	Aéreo	Denso	Abundante	c/picnídios totalmente recobertos	3
	Branco - Levemente Pardo	Baixo (superficial)	Denso	Abundante	c/picnídios bem distribuídos	6
	Pardo	Aéreo	Ralo	Escasso	c/picnídios bem distribuídos	7
MICÉLIO EM TUFOS	Branco				ao redor dos picnídios	4
	Branco-Pardo			Abundante	picnídios bem distribuídos	9
						8

Pelos resultados deste ensaio verificou-se que houve diferença entre os isolados 4 e 10 dos demais, pois apenas ambos induziram sintomas típicos de cancro da haste sobre a cultivar suscetível utilizada.

A incidência da doença foi verificada em 100 % das plantas inoculadas com os isolados 4 e 10, sendo que ambos mostraram-se muito patogênicos. As plantas inoculadas com os demais isolados mostraram-se assintomáticas com referência ao cancro da haste..

TABELA 3. Nota média de severidade obtida em plântulas de soja em casa de vegetação através de inoculação dos diferentes isolados do complexo *Diaporthe/Phomopsis*. UFLA - Lavras, 1995.

Isolados	Média (nota de severidade)
4	4.84 a
10	4.57 b
1	1.00 c
2	1.00 c
3	1.00 c
5	1.00 c
6	1.00 c
7	1.00 c
8	1.00 c
9	1.00 c
MÉDIA	1.74
C.V. %	6.20

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.3.2.2 Caracterização cultural de diferentes isolados do complexo *Diaporthe/Phomopsis* em diferentes meios de cultura.

As taxas de crescimento micelial dos isolados nos diferentes meios de cultura estudados, encontram-se na Tabela 4.

Pelos dados obtidos, verifica-se uma grande variação entre os isolados componentes do complexo *Diaporthe/Phomopsis*, quando cultivados em meio BDA acidificado, e entre os demais meios de cultura estudados.

TABELA 4. Taxa de crescimento micelial (mm/24 h) dos isolados de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* e de *Phomopsis* sp. em diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação. UFLA - Lavras, 1995.

Isolados	Meios	B D A		Farinha de Soja		C Z A P E K	
	T.(°C)	21	25	21	25	21	25
01		16.30 d	24.73 de	13.26 e	18.23 cde	6.73 e	14.48 cd
02		15.90 d	22.23 e	14.36 cde	17.90 cde	11.20 b	13.85 d
03		20.35 bcd	26.03 cde	16.54 bcd	17.68 de	11.38 b	15.93 bcd
04		29.73 a	39.73 a	25.10 a	28.85 a	14.28 a	22.40 a
05		18.35 cd	35.60 ab	19.32 b	23.18 b	9.73 cd	13.93 d
06		20.67 bcd	31.83 bc	16.97 bc	21.30 bc	13.05 a	17.95 bc
07		22.73 bc	25.53 de	14.08 cde	15.23 e	14.00 a	14.65 bcd
08		20.25 bcd	28.35 cd	14.95 cde	14.90 e	8.58 d	13.18 d
09		15.43 d	24.18 de	13.68 de	19.90 bcd	5.93 e	12.85 d
10		25.50 a	34.55 ab	23.90 a	29.35 a	10.40 bc	18.13 b
MÉDIA		20.52	29.27	17.22	20.65	10.53	15.73
C.V. %		11.11	8.41	7.10	7.07	5.71	9.16

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os isolados 4 e 10 foram os que apresentaram maior taxa de crescimento em todos os meios, seguidos pelos isolados 5 e 6. Os demais mostraram-se com crescimento semelhante nos diferentes meios, com exceção do isolado 7 o qual não apresentou um bom crescimento em meio de farinha de soja, porém teve um melhor desempenho no meio czapek, possivelmente em função de algum requerimento nutritivo.

De modo geral, os resultados deste estudo apontam que o melhor meio de cultura para o desenvolvimento micelial foi o meio BDA pH 4,5, à semelhança de resultados encontrados por Seall (1976); Almeida (1981); McGee (comunicação pessoal, 1994)* e Román (1995), seguido pelo meio de farinha de soja e czapek; (Figura 2). A temperatura mais elevada (25°C) proporcionou maiores valores para as taxas de crescimento micelial em todos os meios, o que confirma também resultados de McGee (comunicação pessoal, 1994)* e Román (1995), (Figura 3).

* Curso de detecção de patógenos em sementes (5th ISTA-PDC), Lavras - MG, 1994.

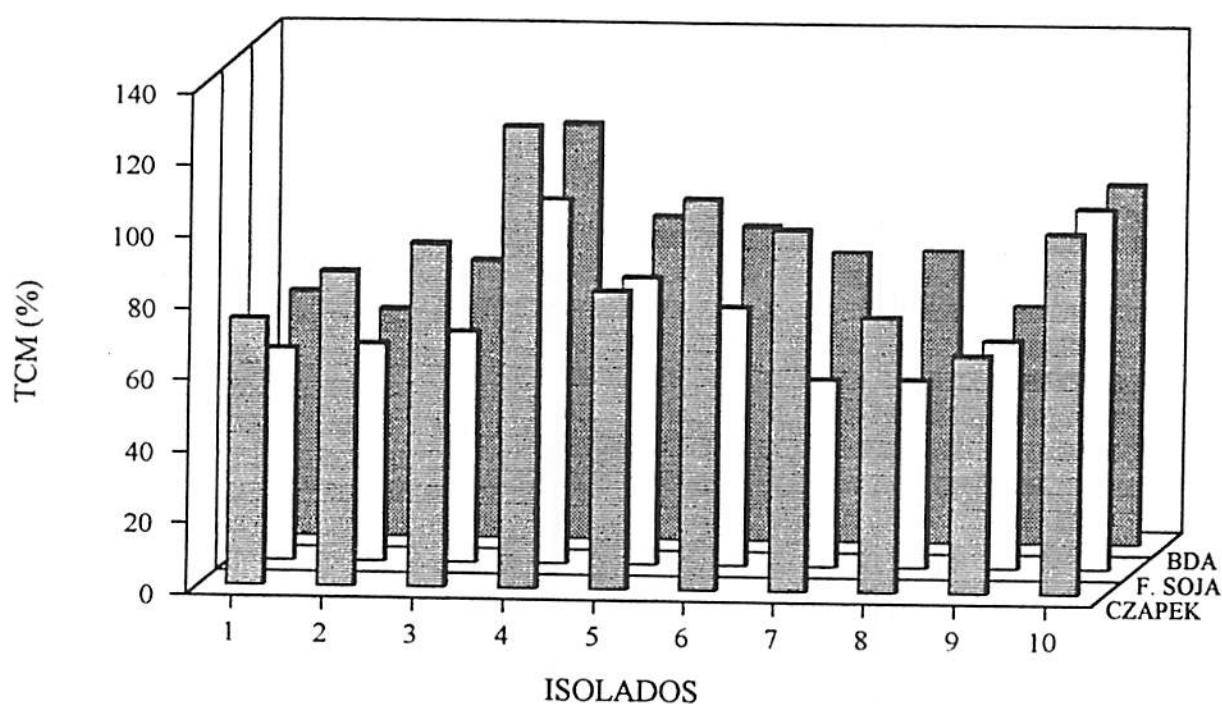


FIGURA 2. Taxa de crescimento micelial-TCM (%) dos isolados de *Phomopsis* spp. em diferentes meios de cultura. UFLA - Lavras, 1995.

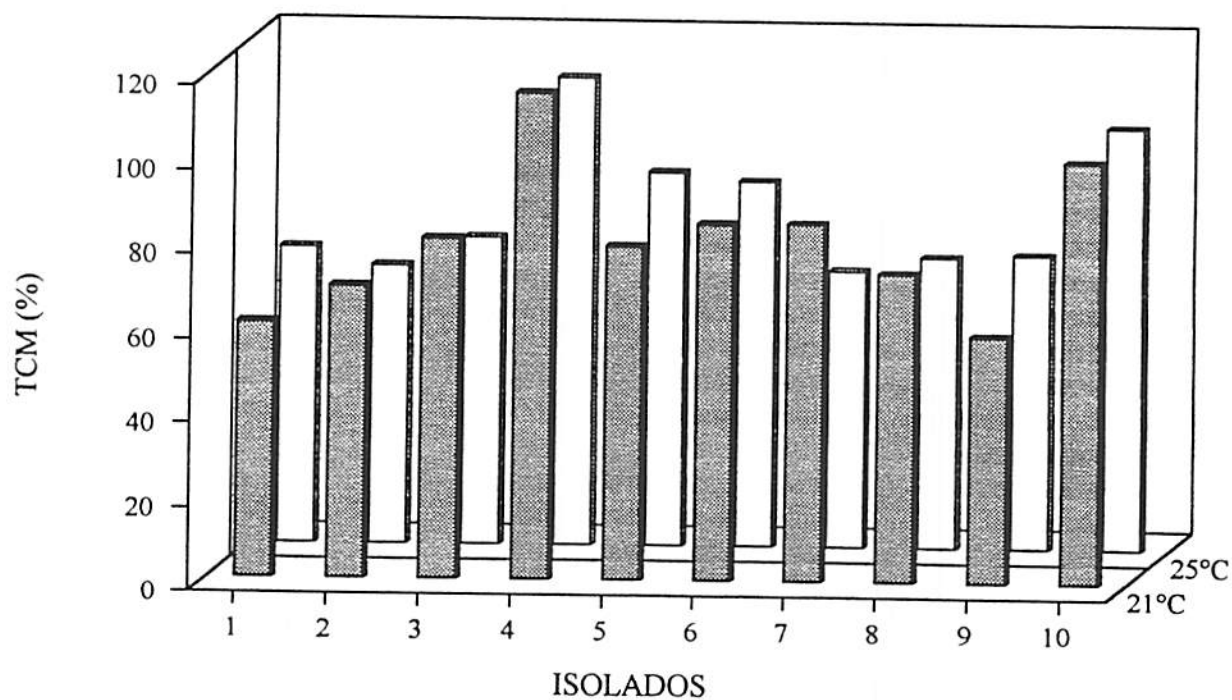


FIGURA 3. Taxa de crescimento micelial-TCM (%) dos isolados de *Phomopsis* spp. em diferentes temperaturas. UFLA - Lavras, 1995.

Resultados semelhantes foram observados por Pacumbaba (1988) quando verificou que o máximo da taxa de crescimento micelial de 11 isolados de *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* foi obtido em meio BDA pH 4,5, porém à temperatura de 20°C sob luz fluorescente contínua.

Leach (1979) relata que o conhecimento da temperatura ideal que favorece o crescimento e a esporulação de cada patógeno é essencial no sentido de manter um critério para sua detecção e identificação.

Os dados referentes às características culturais exibidas pelos diferentes isolados em diferentes meios de cultura, encontram-se agrupados nas Tabelas 5 e 6. Em conformidade com estes dados observa-se a ocorrência de vários tipos de micélio em diferentes isolados, assim como mudança de tipo de micélio de acordo com o meio e o período de incubação, o que evidencia a grande variabilidade existente entre os isolados dentro de um mesmo meio e entre os diferentes meios. Na tentativa de relacionar as características iniciais que deram origem aos diferentes grupos que foram representados pelos 9 isolados, verificou-se que apenas os isolados 4 e 5 apresentaram algumas características semelhantes em todos os meios, em relação às características na superfície das sementes, isto portanto, acarreta a impossibilidade desta interligação, pois as espécies que compõem o complexo de fungos podem apresentar características variadas com respeito a tipo e posição do micélio, quantidade e coloração de picnídios, isto confirmado pelos resultados obtidos através deste estudo, e a semelhança de resultados citados por Yorinori (1991a).

TABELA 5. Agrupamento dos isolados do complexo *Diaporthe/Phomopsis* em soja, em função de suas características culturais em diferentes meios de cultura e temperaturas. UFLA - Lavras, 1995.

Características Miceliais (Topografia e textura)	MEIOS DE CULTURA					
	BDA - pH 4,5		Farinha de Soja		Czapek	
	21°C 12 hs. luz	25°C L. Contínua	21°C 12 hs. luz	25°C L. Contínua	21°C 12 hs. luz	25°C L. Contínua
Aéreo, denso, floculoso e abundante	2, 4, 5, 7, 8, 10	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10	4, 5, 6, 8, 10	1, 3, 4, 5, 6, 9, 10	2, 3, 4, 5, 6, 7, 10	2, 3, 4, 5, 7, 8, 10
Aéreo, ralo, floculoso e escasso	1	-	7	7	-	-
Superficial, frouxo e homogêneo	3, 6	-	1, 2, 9	2, 8	-	-
Superficial, compacto e homogêneo	9	1, 9	3	-	1, 8, 9	1, 6, 9

TABELA 6. Agrupamento dos isolados do complexo *Diaporthe/Phomopsis* em função da coloração micelial da colônia nos diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação. UFLA - Lavras, 1995.

Coloração da colônia			MEIOS DE CULTURA					
Munsell*	Munsell*	Descrição	BDA pH 4,5		Farinha de Soja		Czapek	
			21°C	25°C	21°C	25°C	21°C	25°C
2,5Y	4/4	marrom oliva	-	6	-	-	-	-
	4/2	marrom cinza escuro	-	-	-	-	-	3
	7/2	cinza claro	-	-	1	-	-	-
	8/4	amarelo pálido	-	5	-	-	-	-
5,0Y	7/2	branco cinza claro	-	1	9	-	-	-
	6/3	oliva pálido	-	-	-	-	-	1
7,5Y	8/2	branco rosa pálido	-	-	-	6	-	-
5YR	7/2	cinza rosa pálido	7	8	-	-	-	-
	8/2	branco rosa pálido	2, 5	-	3, 7	-	-	-
	8/3	róseo	3, 8	-	-	7	-	6
7,5YR	7/2	cinza rosa pálido	6	-	-	-	2	-
	8/2	branco rosa pálido	-	3	6	3, 5	3, 5, 7, 8	5, 8
	8/4	róseo	-	-	8	-	6	-
10YR	8/1	branco	1, 9	9	-	1	1, 9	9
	8/2	branco	-	2	-	-	-	-
	8/3	marrom muito pálido	4	-	-	4, 9	4	-
	8/4	marrom muito pálido	-	-	-	-	10	-
	8/6	amarelo	10	4, 10	-	-	-	4, 10
	7/2	cinza claro	-	-	5	-	-	7
	7/4	marrom muito pálido	-	-	-	2	-	-
	6/4	marr. amarelo claro	-	-	2, 4	-	-	-
	6/6	amarelo pardo	-	-	-	8	-	-
	4/2	marrom cinza escuro	-	7	-	-	-	-
	4/6	mar. amarelo escuro	-	-	-	-	-	2
	3/4	mar. amarelo escuro	-	-	10	10	-	-

* Sistema Munsell de notação de cores (tonalidade e intensidade).

O isolado 10 de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, que correspondeu à referência neste estudo, apresentou-se constante quanto às características miceliais estudadas nos 3 meios de cultura; com exceção deste e do isolado 4, os demais apresentaram crescimento da colônia com presença de zoneamentos característicos à temperatura de 21°C, típico da influência do fotoperíodo de 12 h.

Com relação ao meio BDA, os isolados 2, 4, 5, 7, 8, 9 e 10 apresentaram as características miceliais consistentes nas duas temperaturas, os demais apresentaram uma

variação, sendo considerados inconsistentes.; entretanto notaram-se pequenas variações quanto à coloração, tonalidade e/ou intensidade da colônia (Tabela 6).

O desenvolvimento de picnídios foi observado nas culturas dos isolados 2, 4, 7, 8, 9 e 10 na temperatura de 21°C e 3, 4, 7, 8, 9, e 10 na temperatura de 25°C; e a formação de agregados estromáticos foi observada nos isolados 1, 5 e 6 em ambas as temperaturas e no isolado 2 a 25°C, apenas o isolado 3 a 21°C não formou picnídios.

Com relação ao meio de farinha de soja, os isolados que apresentaram as características miceliais consistentes em ambas as temperaturas foram 2, 4, 6, 7 e 10, os demais não se mantiveram constantes, também ocorreu variação quanto à coloração da colônia, sua tonalidade e/ou intensidade. Com exceção do isolado 10, o meio de soja mostrou-se favorável à formação de picnídios para os demais isolados em ambas as temperaturas.

No meio Czapek, com exceção dos isolados 6 e 8 os demais apresentaram as características miceliais constantes em ambas as temperaturas, e a variação na coloração das colônias foi maior a 25°C quando comparada com 21°C.

Com exceção dos isolados 4, 5, e 10 os demais apresentaram picnídios a 21°C, porém a sua maioria encontrava-se em formação, submersos ao meio. Apenas nos isolados 1 e 9 os picnídios apresentavam-se bem formados com a presença de cirros. Na temperatura de 25°C os isolados 1, 2 e 3 apresentaram agrupamentos de picnídios, o isolado 8 apresentou formação de picnídios na periferia da colônia, e os demais não apresentaram esta frutificação aos 14 dias de incubação.

De acordo com citações de literatura (Kulik e Sinclair, 1989; Schmittener, 1989; McGee, (comunicação pessoal, 1994)*, das características estudadas e encontradas em meio BDA pH 4,5 o qual favoreceu o desenvolvimento micelial dos isolados manuseados, deduziu-se que os isolados 1 e 9 correspondem à espécie *Phomopsis longicolla*, os isolados 2, 3, 5, 6, 7 e 8 correspondem à espécie *Phomopsis sojae* e os isolados 4 e 10 correspondem à espécie *Phomopsis phaseoli* f. sp. *meridionalis* (teleomorfo - *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*), (Figura 4).

Estes resultados concordam com citações de Kemtz (1978); Mc Gee (1983); Kulik e Sinclair (1989) e Schimithenner (1989), em que *Phomopsis longicolla* e *Phomopsis sojae* apresentam-se em maior percentual, sendo recuperados mais freqüentemente das sementes que

* Curso de detecção de patógenos em sementes (5th ISTA-PDC), Lavras - MG, 1994.

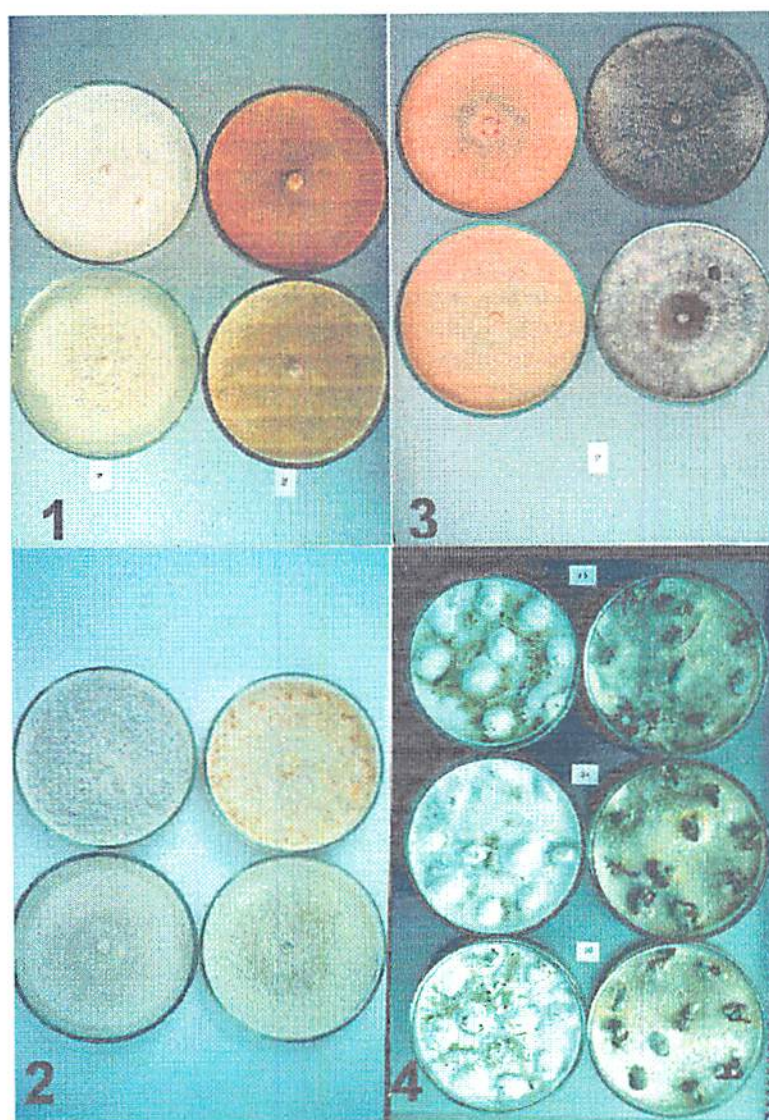


FIGURA 4. Aspectos das colônias de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (*Dpm*) e *Phomopsis* sp. (*P. sp.*) em diferentes substratos e condições de incubação (21°C e 25°C). UFLA - Lavras, 1995.

(1) *Phomopsis* sp. (placas a esquerda) e *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (placas a direita) em Czapek; (2) *Phomopsis* sp. (placas a esquerda) *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (placas a direita) em BDA acidificado; (3) Vista frontal de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* em BDA acidificado (placas a esquerda) e em Farinha de soja (placas a direita); (4) Sementes de soja inoculadas com *Phomopsis* sp. (placas a esquerda) e com *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (placas a direita).

Phomopsis phaseoli f. sp. *meridionalis*, o que é justificado pelo fato deste último apresentar uma baixa transmissibilidade pelas sementes (Backman, Weaver e Morgan-Jones, 1985; Backman, McGee e Morgan-Jones, 1989; Yorinori, 1991a, 1992; Garrido, 1994 e Román, 1995).

Entretanto dois dos isolados considerados como *Phomopsis sojae* (3 e 6), apresentaram detalhes e variações na coloração colonial, que os separava em uma faixa intermediária entre as espécies *Phomopsis sojae* e/ou *Phomopsis longicolla*, por ocasião de sua classificação. Sendo assim, os resultados obtidos permitem concluir que a metodologia proposta para diagnose do agente do cancro da haste em laboratório gera dúvidas devido a grande variabilidade dos fungos pertencentes ao complexo *Diaporthe/Phomopsis*.

É válido considerar também que esta é uma metodologia morosa quando comparada ao teste padrão de sanidade de sementes (“Blotter test”), e em função da necessidade de um rápido diagnóstico em se tratando de trabalhos de rotina em um laboratório de Patologia de Sementes. Porém, a sua viabilidade e aplicação em trabalhos de rotina poderá vir a ser possível com algumas modificações, como a redução do período de incubação, a adição de algum produto inibidor de crescimento ou a adição de algum fungicida seletivo, a exemplo do meio de Phillips (1984), utilizado para diferenciação e detecção de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *caulivora* de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *sojae*.

3.3.3 Avaliação do comportamento de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* e de *Phomopsis* sp. em sementes de soja artificialmente inoculadas, e em condições de teste de sanidade.

3.3.3.1 Condução dos testes de sanidade.

a) Incubação em papel de filtro “blotter test”.

Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 7., onde pode ser observado um efeito significativo entre os diferentes períodos para inoculação ($P < 0,05$).

TABELA 7. Incidência de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* e *Phomopsis* sp. em sementes de soja inoculadas artificialmente. UFLA - Lavras, 1995.

TEMPOS DE EXPOSIÇÃO DAS SEMENTES AO INÓCULO (horas)	FUNGOS			
	<i>D. phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i>		<i>Phomopsis</i> sp.	
	21(±2)°C	25(±2)°C	21(±2)°C	25(±2)°C
Test.	00 c	00 c	00 c	00 b
0	00 c	01 bc	01 c	00 b
15	18 b	26 b	85 b	88 a
24	63 a	63 a	92 ab	93 a
30	64 a	71 a	98 a	93 a
MÉDIA	29	32,2	55,2	54,8
C.V. %	3.1	6.6	2.2	1.03

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Para o isolado de *Phomopsis* sp. não houve diferença significativa entre os tempos de 15 h, 24 h e 30 horas a 25(±2)°C, e entre 30h e 24h a 21(±2)°C. Com respeito ao isolado de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, verificou-se que em ambas as temperaturas os períodos de 24h e 30h de exposição da semente ao inóculo, não apresentaram estatisticamente diferença significativa entre si.

Através dos dados obtidos ficou evidenciado que a exposição mais prolongada das sementes à colônia dos fungos levou a um estabelecimento crescente dos mesmos entre os períodos considerados. Quanto ao tratamento correspondente à exposição momentânea da semente ao inóculo, atribui-se que o processo de assepsia executado no presente caso tenha eliminado possíveis estruturas dos fungos aderidas superficialmente à semente.

Kmetz, Schmitthenner e Ellett (1978) citam que sementes de soja foram infectadas com agentes do complexo *Diaporthe/Phomopsis* quando as mesmas foram expostas ao inóculo por 48 h e 72 h. Sobre este aspecto estudos conduzidos por Almeida (1981) expondo sementes de soja à colônias de *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* em meio BDA, demonstraram que o período de 24 h foi o mais indicado com base no fato de que, quando expostas por um período igual ou superior a 48 h ocorre uma drástica redução de germinação e emergência das sementes.

Os resultados obtidos no presente estudo fazem também com que o período de 24 h de exposição das sementes de soja ao inóculo, seja apontado como o mais conveniente visando estudos posteriores, com vistas à patogenicidade, transmissão do patógeno via sementes, etc.

b) Incubação em meio BDA acidificado.

Pôde-se verificar através da metodologia aplicada resultados semelhantes aos encontrados no teste de incubação em papel de filtro, ou seja, com o aumento do tempo de exposição das sementes ao inóculo, houve uma maior expressão dos patógenos localizados internamente, através de suas características culturais e morfológicas sobre o meio. Entretanto, com a utilização do meio de cultura BDA pH 4,5, a diferenciação das características culturais entre as espécies é visualizada e definida com maior segurança.

Durante o período de incubação e avaliação, foi observado o desenvolvimento de outros microorganismos nas placas contendo sementes com os tratamentos de 0 h, 15 h e testemunha, predominando fungos de armazenamento como *Aspergillus* spp., *Penicillium* sp., além de *Cladosporium* sp., *Chaetomium* sp., *Fusarium* sp. e bactérias. A ausência dos mesmos nas placas contendo sementes com tratamento correspondendo a 24 h e 30 h, sugere que uma possível ação de competição entre os microorganismos possa ter ocorrido, prevalecendo os patógenos inoculados artificialmente.

Não foi verificada diferença na expressão de sintomas sobre o meio em função dos diferentes níveis de inóculos contidos nas sementes utilizadas.

3.3.3.2 Características fenotípicas dos patógenos sobre sementes inoculadas simultaneamente com *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* e *Phomopsis* sp.

Os resultados observados neste estudo não permitiram caracterizar e distinguir com precisão o isolado de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, agente causal do cancro da haste, das diferentes espécies do complexo de patógenos, em sementes inoculadas.

Durante a avaliação verificou-se que independentemente da ordem de inoculação e das condições de temperatura as características de *Phomopsis* sp. responsável principal pela

biodeterioração de sementes foram predominantes. Apesar da dificuldade na detecção do agente causal do cancro da haste em sementes inoculadas, algumas de suas características foram possíveis de ser observadas à temperatura de $25(\pm 2)^{\circ}\text{C}$, tais como, a presença de um halo marrom avermelhado ao redor da semente, sobre o papel de filtro, micélio mais fino e poucos picnídios sobre a superfície da semente.

Embora as condições de inoculação e de incubação tenham sido semelhantes a ambas as espécies do complexo fúngico, algum fator deve atuar impossibilitando *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* no estabelecimento e/ou a expressão de seu perfil sobre a semente.

3.4 CONCLUSÕES

Diaporthe phaseolorum f. sp. *meridionalis* apresenta sensibilidade significativa ao herbicida 2,4-Diclorofenoxiacetato de sódio utilizado a partir da concentração de 5 ppm em testes de sanidade de sementes (“Blotter test”);

Entre os meios de cultura comparados, BDA acidificado foi o que melhor proporcionou condições para detecção e diferenciação de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*;

Variabilidade do fungo *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* em termos culturais (coloração de micélio em sementes, crescimento, diâmetro de colônia e número de frutificações) é relativamente acentuada em todos os meios e condições estudadas neste trabalho;

Detecção de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* em sementes de soja pelo método de incubação em papel de filtro (“Blotter test”), revelou-se inseguro para recomendação em análise de rotina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A.M.R. Efeito de luz e meios de cultura, sobre crescimento micelial, formação e tamanho de picnídios e esporulação de isolados de *Phomopsis sojae* LEH. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 2., Brasília, 1981. *Anais...* Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1982. p.216-226.
- BACKMAN, P.A.; MCGEE, D.C.; MORGAN-JONES, G. In: SINCLAIR, J.B.; BACKMAN, P.A. (eds.). *Compendium of soybean diseases*. 3.ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1989. p.41-43.
- BACKMAN, P.A.; WEAVER, D.B.; MORGAN-JONES, G. Soybean stem canker: an emerging disease problem. *Plant Disease*, St. Paul, v.69, n.8, p.641-647, Aug. 1985.
- FIGUEIREDO, M.B.; PIMENTEL, C.P.V. Métodos de preservação de fungos em cultura. *Biológico*, São Paulo, v.55, n.1/2, p.27-33, jul./dez. 1989.
- GARRIDO, L.R. Cancro da haste: Inóculo primário de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* e reação de plantas de soja à inoculação do patógeno. Viçosa: UFV, 1994. 73p. (Tese - Mestrado em Fitopatologia).
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. *Handbook on seed health testing*: Zurich, 1981. n.p. (Waking sheets section 2).
- JOHNSTON, A.; BOOTH, C. (eds.). *Plant Pathologist's Pocketbook*. London: Commonwealth Mycological Institute, 1983. 439p.
- KEELING, B.L. A seedling test for resistance to soybean stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. *Phytopathology*, St. Paul, v.72, n.7, p.807-809, 1982.
- KEMTZ, K.T.; SCHMITTHENNER, A.F.; ELLETT, C.W. Soybean seed decay: Prevalence of infection and symptom expression caused by *Phomopsis* sp.; *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*, and *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. *Phytopathology*, St. Paul, v.68, p.836-840, June 1978.
- KULIK, M.M.; SINCLAIR, J.B. *Phomopsis* seed decay. In: SINCLAIR, J.B.; BACKMAN, P.A. (eds.). *Compendium of soybean diseases*. 3.ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1989. p.80.
- LEACH, C.M. Environmental conditions and incubation period in seed health testing. In: YORINORI, J.T.; SINCLAIR, J.B.; MEHTA, Y.R.; MOHAN, S.K. (eds.). *Seed Pathology, Problems and Progress*. Proceedings of the First Latin American Workshop on seed Pathology, Londrina, 1977. Londrina: IAPAR, 1979. p.89-102.

- LILLY, V.G.; BARNETT, H.L. **Physiology of fungi**. New York: McGraw-Hill Book, 1951. 464p.
- LUIZ, S.M.; YORINORI, J.T.; MEIRELLES, L.D.P. Condição nuclear em isolados de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* e *Phomopsis phaseoli* f. sp. *meridionalis*. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.17, n.3, p.221, Sept. 1994.
- McGEE, D.C. Epidemiology of soybean seed decay by *Phomopsis* and *Diaporthe* spp. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.11, p.719-729, 1983.
- MACHADO, J. C. **Patologia de Sementes - Fundamentos e aplicações**. Lavras: ESAL/FAEPE, 1988. 107p.
- MACHADO, J.C. **Studies on some seed-borne diseases of Zinnia, African Marigold and Soybean**. Manchester: University of Manchester, 1980. 187p. (Tese - PHD).
- MACHADO, J.C.; LANGERAK, C.I. Improvement of a blotter method to detect economically important fungi associated with seeds of cotton. In: SYMPOSIUM ON SEED HEALTH TESTING, Ottawa, 1993. **Proceedings...** Ottawa: ISTA, 1993. p.48-58.
- MENTEN, J.O.M. Prejuízos causados por patógenos associados às sementes. In: **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 1991. p.115-135. (Anais da 2ª Semana de Atualização em Patologia de Sementes, Piracicaba, 1991).
- MORGAN-JONES, G. The *Diaporthe/Phomopsis* complex: Taxonomic considerations. In: WORD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 4, Buenos Aires, 1989. **Proceedings...** Buenos Aires: Asociacion Argentina de la soya, 1989. v.4, p.1699-1706.
- MUNSELL COLOR COMPANY, INC. **Munsell soil color charts**. Baltimore, 1975. n.p.
- NEERGAARD, P. **Seed Pathology**. London: McMillan Press, 1979. v.1, 839p.
- PACUMBABA, R.P. Variation in structure, growth and pathogenicity of stem canker pathogen from the southeastern United States. **Phytopathology**, St. Paul, v.78, n.5, p.629, 1988. (Abst.).
- PHILLIPS, D.V. A selective medium for *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. **Phytopathology**, St. Paul, v.74, n.7, p.815, 1984. (Abst.).
- ROMÁN, N.R.L. *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*: Caracterização de isolados, avaliação e detecção de fontes de resistência e transmissão por sementes em soja (*Glycine max.*(L.) Merrill). Brasília: UNB, 1995. 96p. (Tese - Mestrado em Fitopatologia).

- SCHMITTHENNER, A.F. Pod and stem blight and Phomopsis seed decay. In: SINCLAIR, J.B.; BACKMAN, P.A. (eds.). **Compendium of soybean diseases**. 3.ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1989. p.38-41.
- SEALL, P.J. **Esporulação e patogenicidade de *Diaporthe phaseolorum* (Cke) ELL var. *sojae* (Lehman) Wehmeyer**. Piracicaba: ESALQ, 1976. 60 p. (Tese - Mestrado em Fitopatologia).
- TUITE, J. **Plant pathological methods**. Mineapolis: Burgess Publishing, 1969. 239p.
- WEAVER, D.B.; SEDHOM, S.A.; SMITH, E.F.; BACKMAN, P.A. Field and greenhouse evaluations of stem canker resistance in soybean. **Crop Science**, Madison, v.28, n.4, p.626-630, 1988.
- YORINORI, J.T. **Cancro da haste da soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1990. 7p. (Comunicado Técnico, 44).
- YORINORI, J.T. Detecção do agente causador do cancro da haste em sementes de soja. In: MENTEN, J.O.M. (ed.). **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 1991a. p.109-113. (Anais da 2ª Semana de Atualização em Patologia de Sementes, Piracicaba, 1991).
- YORINORI, J.T. Identification of *Diaporthe phaseolorum* f. sp. soybean seed by the Blotter test. In: INTERNATIONAL SEED TESTING CONGRESS SYMPOSIUM, 23., Argentina, 1992. **Abstracts...** Argentina, 1992. p.107.
- YORINORI, J.T. Método do palito de dente para seleção de genótipos de soja com resistência ao cancro da haste. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 16., Dourados, 1994. **Resumos...** Dourados: EMBRAPA-CNPO, 1994. p.130-131. (Documentos,3).
- YORINORI, J.T. Metodologia de produção de inóculo de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, n.2, p.53, jun. 1991b.
- YORINORI, J.T.; CHARCHAR, M.J.A.; NASSER, L.C.B.; HENNING, A.A. Doenças da soja e seu controle. In: ARANTES, N.E.; SOUZA, P.I.M.de. (eds.). **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: POTAFOS, 1993. p.333-397. (Anais do Simpósio sobre Cultura da Soja nos Cerrados, Uberaba, 1992).

4 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTAGÔNICO DE *Penicillium aurantiogriseum* A *Diaporthe phaseolorum* f.sp. *meridionalis* “IN VITRO”.

RESUMO

O antagonismo de *Penicillium aurantiogriseum* em relação a *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, agente do cancro da haste da soja, foi testado in vitro”, onde se utilizou a técnica de culturas pareadas e sobreposição em meio BDA, sob diferentes temperaturas (15°C, 20°C, 25°C e 30°C) e em escuro contínuo. A sensibilidade de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* pôde ser verificada após 72 horas de incubação. *Penicillium aurantiogriseum* mostrou-se promissor como agente biocontrolador, inibindo o crescimento micelial do referido patógeno, tendo apresentado um melhor desempenho às temperaturas de 25°C e 20°C. Dentro do período avaliado foi verificada em volta da colônia do antagonista, a presença de um halo de pigmentação amarela sobre o meio de cultura, em todas as temperaturas exceto à 15°C.

SUMMARY

EVALUATION OF THE ANTAGONIC PROPERTY OF *Penicillium aurantiogriseum* TO *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, IN VITRO.

According to earlier studies, *Penicillium aurantiogriseum* was demonstrated to show antagonistic properties to several fungi, in vitro conditions. In the present work, the antagonistic effect of such *Penicillium* species to *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, was evaluated on PDA medium, at four incubation temperatures, 15, 20, 25 and 30°C, using two techniques. In all conditions considered in this study *Penicillium aurantiogriseum* showed to be antagonistic to

Diaporthe phaseolorum f. sp. *meridionalis*; the effect was variable between the extreme temperatures but it was stronger at 25°C.

4.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) tem apresentado uma grande expansão em áreas cultivadas, em decorrência da intensificação de áreas tradicionais, e abertura de novos campos de cultivo. De certa forma isto tem acarretado problemas, principalmente relacionados a qualidade de sementes. Devido ao fato destas não receberem os cuidados fitossanitários necessários visando o controle de patógenos a elas associados, constata-se que muitas doenças transmitidas ou transportadas por esta via têm sido disseminadas entre as regiões de cultivo.

Dentre estas doenças encontra-se o cancro da haste, cujo agente causal é o fungo *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (anamorfo = *Phomopsis phaseoli* f. sp. *meridionalis*) que, uma vez encontrando condições climáticas favoráveis (alta umidade) pode ocasionar perdas parciais ou totais na lavoura (Yorinori, 1990).

Embora a sua transmissão via semente tenha sido considerada baixa (Sinclair e Backman, 1989; Yorinori, 1990; Garrido, 1994), esta apresenta um papel importante como fonte de inóculo, considerando disseminação a longas distâncias (Yorinori, 1990).

A severidade dos danos e as condições climáticas favoráveis, tornam o cancro da haste uma séria ameaça à cultura da soja. O controle da doença tem-se baseado em adoções de práticas agrícolas, resistência varietal e aplicações de defensivos agrícolas.

Henning, Krzyzanowisk e França Neto (1991) e Yorinori et al. (1993) enfatizam a necessidade do tratamento de sementes como uma prática preventiva fundamental, para evitar a disseminação do patógeno.

Além do controle químico via semente, o controle biológico tem-se mostrado como uma opção para minimizar os danos causados por muitas doenças.

Sob este aspecto, o presente estudo teve por objetivo verificar a ação antagonica do fungo *Penicillium aurantiogriseum* a *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, uma vez que por citações de literatura (Machado e Langerak, 1993) e por comunicação pessoal (Langerak e

Machado), tal espécie de *Penicillium* tem-se apresentado como um antagonista de elevado efeito sobre vários outros patógenos de outras culturas.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal de Lavras, no período de março a maio de 1995.

4.2.1 Obtenção e preparo dos isolados em estudo.

O isolado de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* foi obtido de haste de soja cultivar FT - Cristalina com sintomas do cancro da haste, proveniente de Presidente Olegário - MG, safra 1993/94. Para a comprovação da identidade do patógeno, o mesmo foi obtido e multiplicado em cultura pura em meio BDA e inoculado em plantas de soja suscetível, conforme técnica descrita por Yorinori (1991). O isolado de *Penicillium aurantiogriseum* foi obtido junto à micoteca do laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitossanidade da UFLA, sendo o mesmo cultivado e multiplicado em meio BDA da mesma forma que *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*.

4.2.2 Avaliação do efeito antagonista “in vitro”.

Ensaio 1.

Para este estudo utilizou-se a técnica de pareamento e de sobreposição de cultura em meio ágar (Machado e Langerak, 1993).

Discos de 5 mm de diâmetro de meio BDA contendo micélio de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* foram removidos da periferia de colônias de 7 dias de idade e transferidos para a superfície do meio BDA em placa de petri, sendo colocado em cada placa um disco a distância de 3 cm da posição central. Um disco de 5 mm de diâmetro de papel de filtro

umedecido em suspensão conidial de *Penicillium aurantiogriseum* obtida através da raspagem da colônia com pincel e com adição de solução de Tween 80 a 0,01 %, foi transferido para a posição central da placa. A sobreposição de discos de ágar e de papel de filtro contendo inóculo de ambos os fungos foi realizada dentro da mesma placa, sendo posicionados conforme indicado na Figura 5, sendo que o disco de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* sobrepõe o disco de *Penicillium aurantiogriseum*.

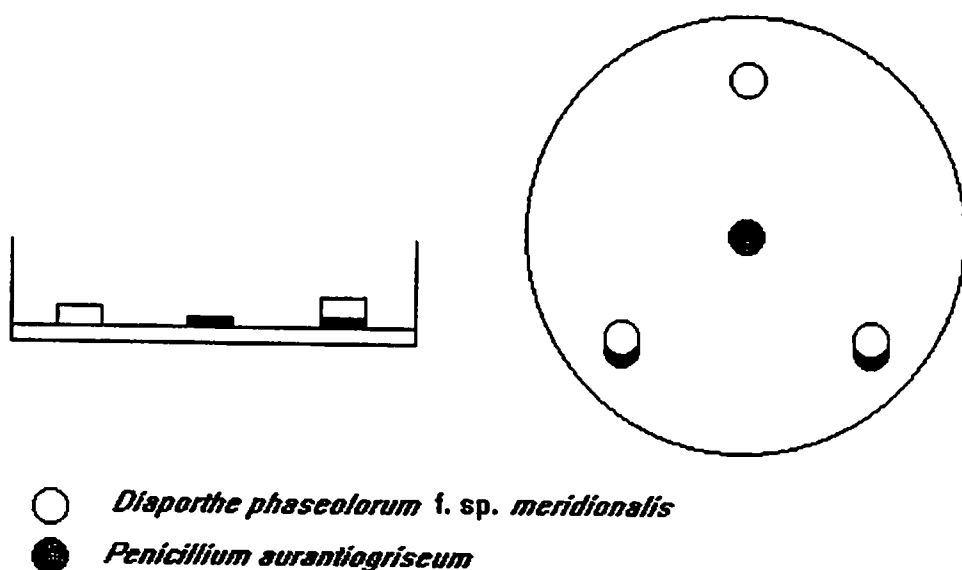


FIGURA 5. Modelo do método de pareamento e de sobreposição de discos de ágar e papel de filtro. UFLA - Lavras, 1995.

A testemunha foi representada pelo crescimento de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* sem a presença do antagonista.

A incubação das placas de petri foi realizada sob 4 diferentes temperaturas, 15°C, 20°C, 25°C e 30°C e em regime de escuro contínuo.

A avaliação foi realizada após 3 dias de incubação, consistindo na medição do crescimento micelial das colônias formadas por ambos os microorganismos, e com estes dados determinou-se a porcentagem de inibição e medição do crescimento micelial das colônias sobrepostas.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 4 tratamentos de temperatura com 7 repetições, perfazendo um total de 28 parcelas, sendo cada parcela representada por uma placa de petri. Os dados obtidos foram transformados em $\log(x + 10)$ e submetidos à análise de variância.

Ensaio 2.

Neste ensaio empregou-se também a técnica de pareamento de culturas conforme descrito no ensaio 1, exceção feita ao início da incubação, que foi diferenciado para ambos os organismos.

Inicialmente, discos de papel de filtro de 5 mm de diâmetro, esterilizados e umedecidos com suspensão conidial de *Penicillium aurantiogriseum*, foram transferidos para pontos a 3 cm do ponto central da placa, sendo as mesmas incubadas sob 4 diferentes temperaturas, 15°C, 20°C, 25°C e 30°C e em regime de escuro contínuo. Após 72 h de incubação, foram transferidos para estas placas discos de 5 mm de diâmetro de meio contendo micélio de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* para pontos opostos aos do *Penicillium aurantiogriseum*, sendo as placas incubadas nas mesmas condições descritas no ensaio 1.

A testemunha foi representada pelo crescimento de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* sem a presença do antagonista, no mesmo período e condições de incubação. A avaliação foi realizada três dias após o pareamento, consistindo na medição do diâmetro do crescimento micelial das colônias formadas por *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, e com estes dados determinou-se a porcentagem de redução do crescimento, através da fórmula:

$$RC\% = \frac{T - TR}{T} \times 100 \text{ onde,}$$

RC = porcentagem de redução de crescimento

T = Testemunha

TR = Tratamento

TABELA 10. Diâmetro médio da colônia de *Penicillium aurantiogriseum* em sistema de sobreposição com *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, sobre meio BDA. UFLA - Lavras, 1995.

TEMPERATURA (°C)	Diâmetro da Colônia ¹ - P. a. ² (mm)
25	18.47 a
20	16.63 b
15	14.10 c
30	11.44 d
MÉDIA	15.16
C.V.%	4.01

^{1/} Média de 7 repetições.

^{2/} *Penicillium aurantiogriseum*.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Ensaio 2.

Neste ensaio observou-se um efeito significativo do isolado de *Penicillium aurantiogriseum*, quando inoculado "in vitro" com 72 h de antecedência ao patógeno (Tabela 11), verificando-se que nas temperaturas de 25°C e 20°C houve uma maior porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*.

TABELA 11. Redução do crescimento micelial (RC) de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* por *Penicillium aurantiogriseum* com 72 horas de crescimento em culturas pareadas em meio BDA em diferentes condições de incubação. UFLA - Lavras, 1995.

TEMPERATURA (°C)	Redução de Crescimento (%) ¹
25	66.00 ² a
20	62.80 a
30	56.00 b
15	00.00 c
MÉDIA	46.20
C.V.%	8.04

^{1/} Porcentagem de inibição após 72 h de pareamento.

^{2/} Média de 5 repetições.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos nesta etapa foram semelhantes àqueles anteriores, quando o plaqueamento do agente antagônico e patógeno foi simultâneo, sendo observada uma maior magnitude dos resultados, em função de uma possível ação preventiva do agente antagônico.

O crescimento do patógeno cessou após a proximidade do contato com o antagonista, a zona de demarcação correspondente a área próxima ao encontro dos dois organismos pareados foi bem caracterizada, assim como a pigmentação amarela produzida pelo antagonista no meio de cultura, exceto na temperatura de 15°C. Não foi verificada interação física entre os fungos em culturas pareadas, porém observaram-se alterações quanto às características de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, apresentando variação na coloração das hifas próximas à zona de demarcação.

Na Tabela 12 verifica-se a mesma tendência no desenvolvimento da colônia de *Penicillium aurantiogriseum* ocorrida anteriormente, por ocasião do plaqueamento simultâneo a *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*.

TABELA 12. Diâmetro médio (mm) do crescimento micelial de *Penicillium aurantiogriseum* em diferentes temperaturas, em culturas pareadas com *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, em meio BDA, plaqueadas com 72 h de antecedência ao pareamento. UFLA - Lavras, 1995.

TEMPERATURA (%)	Diâmetro médio (mm) ¹
20	29.10 ² a
25	29.00 a
15	23.00 b
30	17.40 c
MÉDIA	24.63
C.V.%	2.25

^{1/} Diâmetro médio após 72 h de pareamento.

^{2/} Média de 5 repetições.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A inibição do patógeno produzida pelo antagonista sobre meio ágar, provavelmente tenha sido em função da difusão de alguma substância inibitória, caracterizando o processo de antibiose, que foi favorecido ou melhor visualizado entre temperatura média a alta.

Resultados semelhantes aos apresentados pelo presente trabalho foram encontrados por Machado e Langerak (1993), ao estudarem as propriedades de *Penicillium* spp. “in vitro”, onde verificaram seus efeitos antagônicos a determinados patógenos e retrataram que a constituição do inóculo, doses aplicadas e temperatura, influenciam na resposta da interação entre os microorganismos.

Segundo Cochrane (1958); Edgington et al. (1971); Lima et al. (1975); Minussi, Bredemeier e Weber (1979) existem restrições quanto ao método de avaliação ao desenvolvimento fúngico através do crescimento linear sobre ágar, contudo, este é um dos mais comumente empregados para este tipo de estudo por ser menos laborioso.

Os resultados obtidos com o emprego de *Penicillium aurantiogriseum* em relação à sua capacidade antagônica a *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, de maneira generalizada mostraram-se promissores no biocontrole do agente do cancro da haste da soja “in vitro”. Entretanto, Fravel (1988); Luz (1991); Machado e Langerak (1993) relatam que vários fatores ambientais como textura do solo, nutrientes, pH, temperatura, composição da microflora entre outros, podem influenciar a atividade de um antagonista no campo.

Com base nos resultados analisados e em função da escassez de informações em literatura em relação ao controle biológico de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* através da ação de *Penicillium aurantiogriseum*, sugere-se que trabalhos posteriores sejam desenvolvidos no intuito de obter maiores informações a respeito desta associação. Isolamento e caracterização do composto metabólito tóxico envolvido, mecanismos de ação desse(s) composto(s) em relação ao patógeno, tecnologia de formulação, são alguns dos aspectos a serem investigados.

4.4 CONCLUSÕES

Penicillium aurantiogriseum apresenta-se como agente promissor no biocontrole de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*;

A temperatura de 25°C propiciou uma maior redução do crescimento micelial de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* pelo agente antagônico;

A ação antagônica de *Penicillium aurantiogriseum* ficou mais evidenciada quando o mesmo já se encontrava estabelecido no substrato (BDA).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COCHRANE, V.W. Cultivation and growth. In: **Physiology of fungi**: New York: J. Willey, 1958. cap.1, p.1-34.
- EDGINGTON, L.V.; KHEN, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, St. Paul, v.61, n.1, p.42-44, Jan. 1971.
- FRAVEL, D.R. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.26, p.75-91, 1988.
- GARRIDO, L.R. **Cancro da haste: Inóculo primário de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* e reação de plantas de soja à inoculação do patógeno**. Viçosa: UFV, 1994. 73p. (Tese - Mestrado em Fitopatologia).
- HENNING, A.A.; KRZYKANOWISK, F.C.; FRANÇA NETO, J.B. Eficácia do tratamento de sementes de soja com fungicidas no controle dos principais fungos fitopatogênicos transmitidos pela semente. **Informativo ABRATES**, v.1, n.4, p.68, set. 1991.
- LIMA, J.A.A.; MENEZES, M.; KARAM, M.Q.; OLIVEIRA, V.P.; RODRIGUES, M.G. Ação tóxica de alguns fungicidas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ, agente da antracnose do cajueiro. **Fitossanidade**, Fortaleza, v.1, n.2, p.62-66, jul. 1975.
- LUZ, W.C. Controle biológico das doenças na espermosfera. In: BETTIOL, W. (org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p.25-31.
- MACHADO, J.C.; LANGERAK, C.J. A new technique for studying antagonistic properties of fungi in vitro. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 6., Montreal, 1993. **Abstracts...** Montreal: Canadian Phytopathological Society, 1993. p.63.
- MINUSSI, E.; BREDEMEIER, F.D.; WEBER, L.F. Efeito fungitóxico in vitro de alguns fungicidas sobre o crescimento micelial de *Helminthosporium sativum* PAM. KING & BAKKE. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.4, n.3, p.487-491, out. 1979.
- SINCLAIR, J.A.; BACKMAN, P.A. (eds.). **Compendium of soybean diseases**. 3.ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1989. 106p.
- YORINORI, J.T. **Cancro da haste da soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPDSO, 1990. 7p. (Comunicado Técnico, 44).
- YORINORI, J.T. Metodologia de produção de inóculo de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.16, n.2, p.53, jun. 1991.
- YORINORI J.T.; CHARCHAR, M.J.A.; NASSER, L.C.B.; HENNING, A.A. Doenças da soja e seu controle. In: **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: POTAFOS, 1993. p.333-397. (Anais do Simpósio sobre Cultura da Soja nos Cerrados, Uberaba, 1992).

5 SENSIBILIDADE “IN VITRO”, DE *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* AO FUNGICIDA THIRAM EM COMBINAÇÃO COM *Penicillium aurantiogriseum*.

RESUMO

O trabalho constou de avaliações “in vitro” do crescimento micelial de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* na presença do antagonista *Penicillium aurantiogriseum* em meio BDA, contendo diferentes concentrações de thiram e sob duas temperaturas 20°C e 25°C de incubação. Houve uma diferença significativa entre os tratamentos aplicados, havendo em todos uma inibição do crescimento micelial. Em ambas as temperaturas, todas as dosagens de thiram apresentaram efeito redutor sobre o crescimento de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, entretanto, foi verificado que na temperatura de 25°C e no meio contendo thiram na dose de 20 ppm, a ação do antagonista apresentou-se de modo geral mais eficiente.

SUMMARY

SENSIBILITY IN VITRO OF *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* TO THE COMBINATION OF THIRAM WITH *Penicillium aurantiogriseum*.

Basing on the results of earlier studies in which *Penicillium aurantiogriseum* had shown antagonistic properties to *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* in vitro, growth of this pathogen was evaluated, in this work, on PDA medium containing thiram at different concentrations and in the presence of *Penicillium aurantiogriseum* under different incubation conditions. Both, thiram and the antagonist, caused reduction of the mycelial growth of *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* in all treatments. The effect of both agents, was

higher when they come together at 25°C on medium containing thiram at concentrations over 20 ppm.

5.1 INTRODUÇÃO

O cancro da haste, causado por *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (Morgan-Jones), é atualmente uma das mais sérias doenças da cultura da soja, podendo ocasionar sérias perdas econômicas nas áreas de cultivo, sob condições favoráveis ao seu desenvolvimento, devido à morte prematura de plantas (Yorinori, 1990).

O patógeno pode sobreviver em restos culturais contaminados e em sementes, e embora tenha sido constatada a baixa transmissão por meio desta (Sinclair e Backman, 1989; Garrido, 1994) o seu papel como fonte de inóculo, considerando disseminação a longas distâncias, introduzindo o patógeno ou novas raças em áreas indenes é muito importante.

Entre as estratégias de controle da referida doença, estão o uso de cultivares resistentes, práticas agrícolas adequadas como a rotação de culturas e, o uso de sementes livres do patógeno. O tratamento de sementes como uma prática preventiva é fundamental, para evitar a disseminação do patógeno, sendo enfatizada por diversos autores como Henning, Krzyzanowisk e França Neto (1991), Yorinori et al. (1993).

Além do controle químico via semente, o controle biológico para inúmeros casos tem se mostrado como uma opção promissora para minimizar os danos causados por inúmeras doenças de modo geral.

De grande importância já conhecida na literatura é a possibilidade de combinar o tratamento químico e biológico no controle de alguns patógenos. Tal estratégia tem sido investigada na tentativa de reduzir o uso de defensivos químicos. Especificamente para o caso de thiram e *Penicillium aurantiogriseum*, a combinação dos mesmos tem sido considerada como efetiva no controle de alguns fungos de importância como *Colletotrichum gossypii* e algumas espécies de *Alternaria* em brássicas e cenoura (Machado e Langerak, comunicação pessoal). A combinação desses princípios, quando possível, é vantajosa sob vários aspectos.

O presente trabalho teve por objetivo verificar o efeito combinado de *Penicillium aurantiogriseum* e do fungicida thiram, “in vitro”, sobre o crescimento micelial de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O isolado de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* utilizado neste trabalho foi proveniente de haste de soja cultivar FT Cristalina e coletada na região de Presidente Olegário, MG. As culturas puras utilizadas foram obtidas em meio BDA com incubação por 7 dias a $25(\pm 2)^{\circ}\text{C}$ sob fotoperíodo de 12 horas, empregando-se luz NUV, fornecida por lâmpadas SILVÂNIA F30 colocadas a 40 cm acima das placas de petri.

O isolado de *Penicillium aurantiogriseum* codificado como P114, foi obtido na micoteca do Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal de Lavras, sendo cultivado e multiplicado nas mesmas condições de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*.

Para realização deste estudo empregou-se o meio de cultura BDA, ao qual após esterilização e à temperatura 45°C , foi incorporado o fungicida thiram (pó seco com 70% de ingrediente ativo) em diferentes concentrações (5, 10, 20, 40 e 80 ppm). A cada placa de petri de 90 mm de diâmetro adicionou-se o volume de 15 ml do meio.

Para avaliar o efeito antagônico utilizou-se a técnica de culturas pareadas onde um disco de meio ágar de 5 mm de diâmetro contendo micélio de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, retirado da periferia da colônia em crescimento, foi transferido para a superfície do meio a uma distância de 3 cm da posição central. Na posição diametralmente oposta foi depositado um disco de papel de filtro de 5 mm de diâmetro saturado com suspensão conidial de *Penicillium aurantiogriseum*. A testemunha foi representada pelo crescimento de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* sem a presença do antagonista e do fungicida.

A incubação foi realizada em condições de temperatura de $20(\pm 2)^{\circ}\text{C}$ e $25(\pm 2)^{\circ}\text{C}$ sob escuro contínuo. A avaliação foi realizada após 6 dias da incubação do ensaio, considerando-se a área de achatamento da colônia do patógeno, tendo como referência a colônia da testemunha.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 5 com um tratamento adicional, sendo 2 tratamentos (*Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* e *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* + *Penicillium aurantiogriseum*) e 5 níveis de concentrações do fungicida thiram (5, 10, 20, 40 e 80 ppm) e tratamento adicional *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* x *Penicillium aurantiogriseum*, com 4 repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, após transformação para $\sqrt{x+1}$.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelos resultados expressos na Tabela 13 verifica-se que houve diferença significativa entre todos os tratamentos. Isto indica que tanto a ação isolada de *Penicillium aurantiogriseum*, como de thiram e a combinação de ambos exerceram um efeito pronunciado sobre o crescimento de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*. O efeito repressor foi tanto mais pronunciado no tratamento em que se combinou o antagonista com thiram, indicando claramente neste caso, um efeito sinérgico do tratamento (Figura 6).

TABELA 13. Porcentagem média de redução de crescimento de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, na presença de *Penicillium aurantiogriseum* e em meio BDA contendo fungicida thiram. UFLA - Lavras, 1995.*

Tratamentos	Porcentagem de redução do crescimento micelial	
	20(±2)°C	25(±2)°C
DPM ¹ +P114 ² +TH ³	91,45 a	93,10 a
DPM+THIRAM	81,75 b	85,70 b
DPM+P114	71,00 c	77,50 c
Média Geral	81,40	85,43
C.V. %	2,19	2,13

* Avaliação realizada após 144 horas de incubação (6 dias).

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

^{1/} - *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*

^{2/} - *Penicillium aurantiogriseum*

^{3/} - fungicida thiram

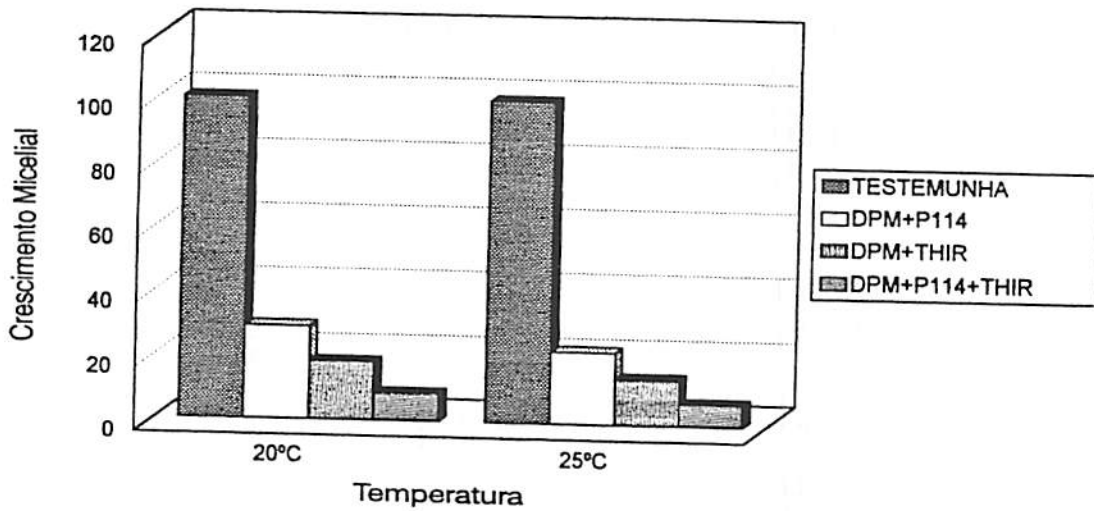


FIGURA 6. Efeito dos tratamentos químico e biológico na redução (%) do crescimento micelial de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*. UFLA - Lavras, 1995.

Houve diferença significativa entre efeitos de tratamentos (*Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* e *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* + *Penicillium aurantiogriseum*), concentrações de thiram e na interação tratamentos x concentrações (Tabela 14).

Na temperatura de 20(±2)°C para a interação *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* x concentrações de thiram, verificou-se que a dosagem de 20 ppm apresentou uma maior redução do crescimento micelial em relação a 10 e 5 ppm e, para a interação *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* + *Penicillium aurantiogriseum* x concentrações não houve diferença estatística entre as três concentrações, sendo que todas apresentaram efeito redutor sobre *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (Figura 7).

TABELA 14. Porcentagem de redução de crescimento de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, na presença de *Penicillium aurantiogriseum* em meio BDA e em diferentes concentrações de thiram. UFLA - Lavras, 1995.*

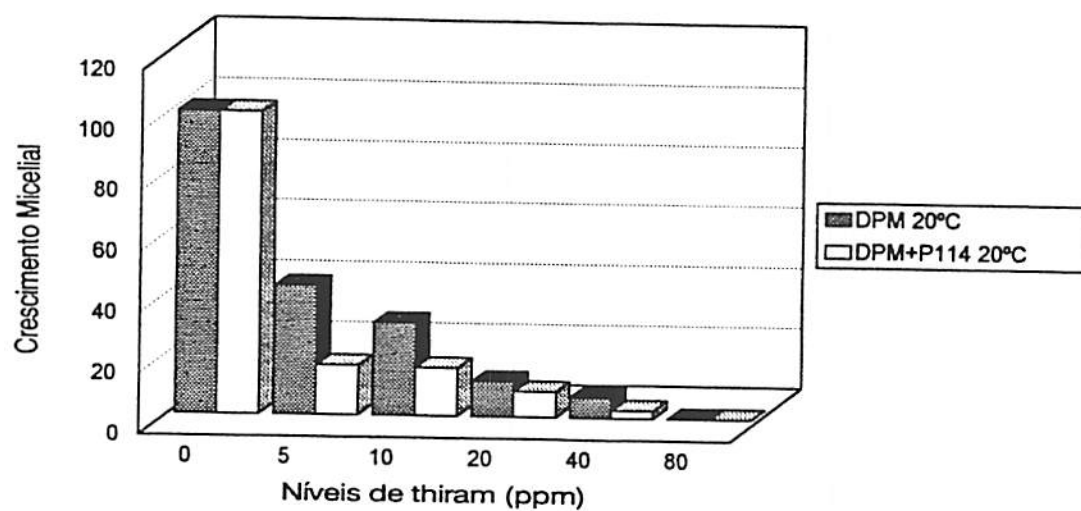
Concentrações de i. a. (ppm)	20 (\pm 2)°C		25 (\pm 2)°C	
	DPM ¹	DPM+P114 ²	DPM	DPM+P114
5	57,50 d B	83,75 c A	64,50 c B	87,23 b A
10	69,50 c B	84,25 c A	72,50 b B	85,00 b A
20	88,50 b A	91,75 b A	94,50 a A	95,25 a A
40	93,25 ab A	97,50 ab A	97,00 a A	98,00 a A
80	100,00 a A	100,00 a A	100,00 a A	100,00 a A
Média Geral	81,68	91,45	85,66	93,08
C.V. %	3,50	3,50	3,60	3,60

* Avaliação realizada após 144 horas de incubação (6 dias).

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, para cada temperatura indicada, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

^{1/} - *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*

^{2/} - *Penicillium aurantiogriseum*

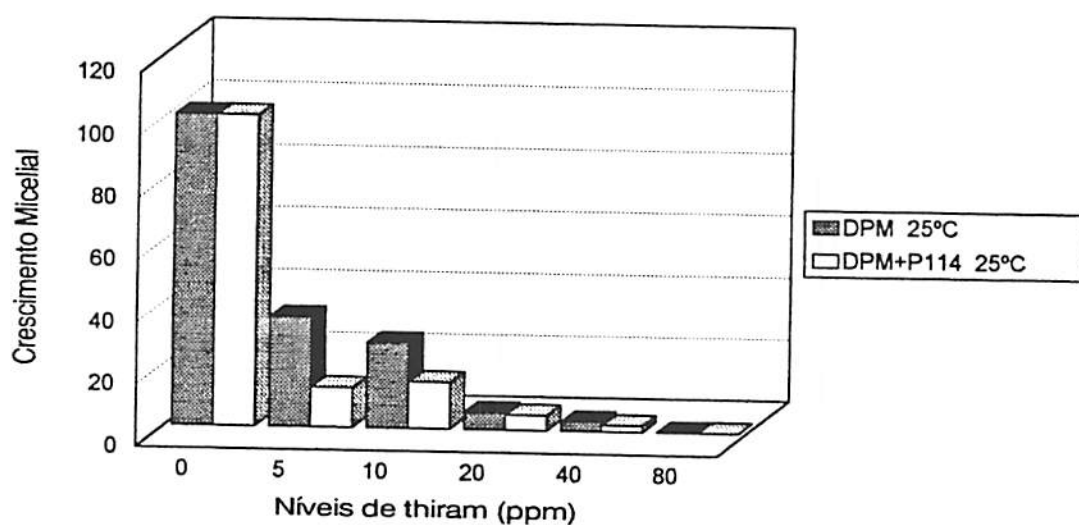


DPM - *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*

P114 - *Penicillium aurantiogriseum*

FIGURA 7. Redução (%) do crescimento de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* “in vitro”, por *Penicillium aurantiogriseum* e thiram à 20(\pm 2)°C. UFLA - Lavras, 1995.

Por sua vez na temperatura de $25(\pm 2)^{\circ}\text{C}$ para a interação *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* x concentrações de thiram e para *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* + *Penicillium aurantiogriseum* x concentrações, a dosagem de 20 ppm apresentou-se mais efetiva que a dosagem de 10 e 5 ppm considerando-se que neste caso, não havendo diferença estatística em relação às concentrações mais altas, a mesma seja mais conveniente do ponto de vista de redução do uso deste tipo de defensivo. embora todas tenham apresentado efeito de redução sobre o crescimento micelial de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (Figura 8).



DPM - *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*
P114 - *Penicillium aurantiogriseum*

FIGURA 8. Redução (%) do crescimento de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* “in vitro”, por *Penicillium aurantiogriseum* e thiram à $25(\pm 2)^{\circ}\text{C}$. UFLA - Lavras, 1995.

Os resultados encontrados neste trabalho de certa forma concordam com a citação de Richardson (1973), o qual observou a sobrevivência de *Penicillium* sp. na presença de thiram a 50 ppm.

Fravel (1988); Luz (1991); Machado e Langerak (1993) argumentam que nem sempre existe uma relação entre os resultados “in vitro” e a atividade de biocontrole no campo,

pelo fato de que outros fatores podem influenciar seu comportamento como textura do solo, nutrientes, pH, temperatura, composição de microflora, etc.; desta forma, os resultados obtidos neste estudo apontam a necessidade de executar novos ensaios em laboratório, casa de vegetação e a campo em diferentes regiões, para que se possa obter resposta de um efetivo controle deste patógeno em sementes.

5.4 CONCLUSÕES

Houve um efeito sinérgico entre o fungicida thiram e o agente antagonístico *Penicillium aurantiogriseum* na inibição do crescimento micelial de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* "in vitro";

A dosagem de 20 ppm de thiram representou melhor a interação entre os agentes químico e biológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FRAVEL, D.R. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.26, p.75-91, 1988.
- GARRIDO, L.R. **Cancro da haste: Inóculo primário de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* e reação de plantas de soja à inoculação do patógeno.** Viçosa: UFV, 1994. 73p. (Tese - Mestrado em Fitopatologia).
- HENNING, A.A.; KRZYWANOWISK, F.C.; FRANÇA NETO, J.B. Eficácia do tratamento de sementes de soja com fungicidas no controle dos principais fungos fitopatogênicos transmitidos pela semente. **Informativo ABRATES**, v.1, n.4, p.68, set. 1991.
- LUZ, W.C. Controle biológico das doenças na espermosfera. In: BETTIOL, W. (org.). **Controle biológico de doenças de plantas.** Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p.25-31.
- MACHADO, J.C.; LANGERAK, C.J. A new technique for studying antagonistic properties of fungi in vitro. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 6., Montreal, 1993. **Abstracts...** Montreal: Canadian Phytopathological Society, 1993. p.63.
- RICHARDSON, L.T. Sinergism between chloroneb and thiram applied to peas to control seed rot and damping-off by *Pythium ultimum*. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v.57, n.1, p.3-4, Jan. 1973.

SINCLAIR, J.A.; BACKMAN, P.A. (eds.). **Compendium of soybean diseases**. 3.ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1989. 106p.

YORINORI, J.T. **Cancro da haste da soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1990. 7p. (Comunicado Técnico, 44).

YORINORI J.T.; CHARCHAR, M.J.A.; NASSER, L.C.B.; HENNING, A.A. Doenças da soja e seu controle. In: **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: POTAFOS, 1993. p.333-397. (Anais do Simpósio sobre Cultura da Soja nos Cerrados, Uberaba, 1992).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante da importância da utilização de semente de boa qualidade como insumo básico na produção agrícola, é de vital importância levar em consideração o conhecimento de sua microflora, visto esta poder interferir na produtividade da cultura.

Sob este aspecto, procurou-se maiores informações com respeito ao fungo *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, agente causal do cancro da haste da soja e também componente do complexo fúngico responsável pela biodeterioração de sementes.

Os resultados observados neste estudo ratificam os relatos de Yorinori (1991), com respeito à dificuldade de detecção e diferenciação do referido patógeno através do teste de papel de filtro, assim como, evidencia a influência do herbicida 2,4-D utilizado no teste de sanidade sobre o desenvolvimento micelial de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* em concentrações acima de 5 ppm. A recuperação deste agente da semente foi possível, contudo, foi baixa comparada às demais espécies do complexo fúngico, confirmando citações de Kmetz, Schmittenner e Ellett (1978); McGee (1983); Kulik e Sinclair (1989); Schmithenner (1989).

A sua diferenciação através do método de ágar em placa foi possível ao utilizar o meio BDA acidificado, sendo que resultados semelhantes foram observados por McGee e Biddle (1987), entretanto, a sua aplicação em análise de rotina de certa forma não é viável, visto necessitar de uma série de exigências de ordem material e humana, contrariando requisitos básicos em patologia de sementes na escolha de um teste de sanidade, que é entre outros, a sensibilidade e rapidez. Contudo, esta metodologia poderá sofrer alterações que favoreçam a sua aplicabilidade, como exemplo, a adição de produto seletivo e/ou inibidor de outros agentes que possam interferir na identificação de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*. Sob o aspecto de pesquisa científica a sua utilização ainda constitui uma ferramenta útil.

Considerando o aspecto de sementes artificialmente inoculadas para estudos de patologia, verificou-se que o processo de inoculação utilizado é eficiente, havendo

proporcionalidade do percentual de infecção ao tempo de exposição das sementes à colônia fúngica. Através do teste de incubação em papel de filtro pode-se observar que, em sementes artificialmente inoculadas com *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* e com *Phomopsis* sp., as características predominantes foram de *Phomopsis* sp., inferindo-se desta forma, que algum fator ou mecanismo seja ele bioquímico, de competição ou outros, interfere na expressão dos sintomas do agente do cancro sobre a semente infectada.

Diante do estabelecimento do agente do cancro da haste em diversas áreas de cultivo da soja, faz-se necessária entre outras medidas, a utilização do tratamento químico de sementes (Henning, Krzyzanowisk e França Neto, 1991) para evitar a sua disseminação para novas regiões, eliminando o patógeno, protegendo tanto as sementes quanto as plântulas. Entretanto, a contínua utilização de produtos químicos isoladamente apresenta alguns inconvenientes, entre eles, o desequilíbrio ecológico e surgimento de resistência de patógenos.

Entre as alternativas para o combate de doenças, encontra-se o controle biológico, e os resultados encontrados através do presente estudo mostraram que a utilização de *Penicillium aurantiogriseum* como agente biocontrolador de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* "in vitro", assim como a sua combinação com o fungicida thiram é viável, para tanto, estudos complementares devem ser delineados na busca de respostas positivas "in vivo".

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HENNING, A.A.; KRZYZANOWISK, F. C.; FRANÇA NETO, J.B. Eficácia do tratamento de sementes de soja com fungicidas no controle dos principais fungos fitopatogênicos transmitidos pela semente. **Informativo ABRATES**, v.1, n.4, p.68, set. 1991.
- KEMTZ, K.T.; SCHMITTHENNER, A.F.; ELLETT, C.W. Soybean seed decay: Prevalence of infection and symptom expression caused by *Phomopsis* sp.; *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*, and *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. **Phytopathology**, St. Paul, v.68, p.836-840, June 1978.
- KULIK, M.M.; SINCLAIR, J.B. *Phomopsis* seed decay. In: SINCLAIR, J.B.; BACKMAN, P.A. (eds.). **Compendium of soybean diseases**. 3.ed. St. Paul: The American Phythopathological Society, 1989. p.80.
- McGEE, D.C. Epidemiology of soybean seed decay by *Phomopsis* and *Diaporthe* spp. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.11, p.719-729, 1983.

- McGEE, D.C. ; BIDDLE, J.A. Seedborne *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* in Iowa and its relationship to soybean stem canker in the southern United States. **Plant Disease**, St. Paul, v.71, n.1, p.620-622, 1987.
- SCHMITTHENNER, A.F. Pod and stem blight and Phomopsis seed decay. In: SINCLAIR, J.B.; BACKMAN, P.A. (eds.). **Compendium of soybean diseases**. 3.ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1989. p.38-41.
- YORINORI, J.T. Detecção do agente causador do cancro da haste em sementes de soja. In: MENTEN, J.O.M. (ed.). **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 1991. p.109-113. (Anais da 2ª Semana de Atualização em Patologia de Sementes, Piracicaba, 1991).