

ISSN 0104-5172

Augusto César Pereira Goulart

Fungos em Sementes de Soja: Detecção e Importância

The logo for Embrapa, featuring the word "Embrapa" in a bold, italicized sans-serif font. The letter "a" is stylized with a large, solid black circular shape behind it, partially overlapping the letter.

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária do Oeste
Ministério da Agricultura e do Abastecimento*

Dourados, MS
1997

EMBRAPA-CPAO. Documentos, 11

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:
EMBRAPA-CPAO
Setor de Marketing e Comercialização - SMC
Rod. Dourados-Caarapó, km 5, Caixa Postal 661
Fone: (067) 422-5122 - Fax (067) 421-0811
79804-970 Dourados, MS

COMITÊ DE PUBLICAÇÕES:

Júlio Cesar Salton (Presidente)
André Luiz Melhorança
Augusto César Pereira Goulart
Carlos Hissao Kurihara
Clarice Zanoni Fontes
Edelma da Silva Dias
Eliete do Nascimento Ferreira

Guilherme Lafourcade Asmus
José Ubirajara Garcia Fontoura

Membros "ad hoc"

Mário Artemio Urchei
Paulino José Melo Andrade
Héber Ferreira dos Reis

PRODUÇÃO GRÁFICA:

Coordenação: Clarice Zanoni Fontes
Diagramação e Revisão: Eliete do Nascimento Ferreira
Normalização: Eli de Lourdes Vasconcelos

TIRAGEM: 1.500 exemplares

FOTOS DA CAPA: Augusto César Pereira Goulart

GOULART, A.C.P. **Fungos em sementes de soja:** detecção e importância. Dourados: EMBRAPA-CPAO, 1997. 58p. (EMBRAPA-CPAO. Documentos, 11)

1.Soja-Semente-Fungo.I.Título.II.Série.

CDD 633.3494

© EMBRAPA, 1997

SUMÁRIO

RESUMO, 5

ABSTRACT, 7

1. INTRODUÇÃO, 9

2. SANIDADE, 10

3. PRINCIPAIS FUNGOS ENCONTRADOS EM SEMENTES DE SOJA, 11

3.1. *Phomopsis* spp., 12

3.2. *Colletotrichum truncatum* - Antracnose, 14

3.3. *Cercospora kikuchii* - Mancha púrpura, 14

3.4. *Cercospora sojina* - Mancha "olho-de-rã", 15

3.5. *Rhizoctonia solani* - Tombamento e morte em reboleira, 15

3.6. *Sclerotinia sclerotiorum* - Podridão branca da haste e da vagem, 16

3.7. *Fusarium semitectum*, 16

3.8. *Aspergillus* spp., 17

3.9. *Penicillium* spp., 17

4. TESTES DE SANIDADE DE SEMENTES DE SOJA, 18

4.1. Importância do teste de sanidade, 18

4.2. Necessidades básicas de um laboratório para análise sanitária de sementes, 18

4.3. Métodos de detecção de patógenos em sementes de soja, 21

5. TRATAMENTO DE SEMENTES DE SOJA COM FUNGICIDAS, 25

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, 29

6. ANEXO, 34

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Fernando Henrique Cardoso
Presidente

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO

Arlindo Porto Neto
Ministro

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA

Alberto Duque Portugal
Presidente

Elza Angela Battaggia Brito da Cunha
José Roberto Rodrigues Peres
Dante Daniel Giacomelli Scolari
Diretores

CENTRO DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DO OESTE

José Ubirajara Garcia Fontoura
Chefe Geral

Júlio Cesar Salton
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

André Luiz Melhoreança
Chefe Adjunto de Apoio Técnico

Josué Assunção Flores
Chefe Adjunto Administrativo



Embrapa

***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária do Oeste
Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Rod. Dourados-Caarapó km 5 79804-970 Dourados MS
Telefone (067) 422-5122 Fax (067) 421-0811***

FUNGOS EM SEMENTES DE SOJA: Detecção e Importância

Augusto César Pereira Goulart¹

RESUMO

A simples indicação das percentagens de pureza, germinação e vigor de um lote de sementes não é suficiente para caracterizar a sua verdadeira qualidade, sendo necessário, obrigatoriamente, levar em conta o somatório dos atributos físicos, genéticos, fisiológicos e sanitários. A condição sanitária é extremamente importante, considerando-se que as sementes são veículos de agentes fitopatogênicos, que nelas podem se alojar e com elas serem levados ao campo, provocando redução de germinação e vigor e originando focos primários de doenças. A maioria das doenças de importância econômica que ocorre na soja é causada por patógenos que são transmitidos pelas sementes. Dentre eles, merecem destaque: *Phomopsis* spp. - anamorfo de *Diaporthe* spp. (causador do cancro da haste da soja, da seca da haste e da vagem da soja e da deterioração das sementes), *Cercospora sojina* (causador da mancha olho-de-rã), *C. kikuchii* (causador da mancha

¹ Eng.-Agr., M.Sc., Fitopatologista, EMBRAPA-CPAO, Caixa Postal 661, 79804-970 - Dourados, MS.

púrpura da semente e do crestamento foliar), *Colletotrichum truncatum* (causador da antracnose), *Fusarium semitectum* (causador da deterioração das sementes), *Aspergillus flavus* (fungo de armazenamento), *Sclerotinia sclerotiorum* (causador da podridão branca da haste e da vagem) e *Rhizoctonia solani* (causador do tombamento de plântulas e morte em reboleira). Esses patógenos são detectados e identificados nas sementes de soja através da realização de um teste específico (**Teste de Sanidade** ou de **Patologia de Sementes**). Seu objetivo principal é determinar o estado sanitário de uma amostra de sementes. Esse teste é realizado em um laboratório, que precisa ter os seguintes equipamentos: câmaras de incubação, estereomicroscópio binocular (lupa), microscópio composto binocular, recipientes (gerbox e placas de Petri de plástico ou de vidro), substrato (papel de filtro), capela de fluxo laminar, estufas para esterilização (fornos Pasteur), autoclave e outros utensílios (pinças, bisturis, estiletes, tesouras e alças de platina). Vários testes de laboratório podem ser utilizados para caracterizar o estado sanitário das sementes de soja. O principal, utilizado e recomendado internacionalmente, é o **Método do papel de filtro** ou **Blotter test**, que detecta a quantidade total de fungos presentes nas sementes (interna e externamente). Outros métodos também podem ser utilizados, como o **Deep Freezing Method** e o **Método de incubação em ágar**. Consta ainda neste trabalho um Anexo, contendo as estruturas e descrições dos principais fungos encontrados em sementes de soja.

FUNGI IN SOYBEAN SEEDS:

Detection and Importance

ABSTRACT

The sole indication of purity, germination and vigor indexes in a seed lot is not sufficient to characterize its true class. One should also take into account the sum of the physical, genetic, physiologic, and sanitary traits to better characterize a seed lot. The sanitary condition is extremely important if one considers that many pathogens may be seed-borne. If a pathogen is taken to the field with the seed, it can reduce the seed germination and vigor indexes and originate disease primary foci. As for the soybean diseases, most of them are incited by seed-borne pathogens. Among these, the most important are: *Phomopsis* spp. - anamorph of *Diaphorte* spp. (cause of stem canker, stem and pod blight, and seed deterioration); *Cercospora sojina* (frog leaf spot); *C. kikuchii* (purple seed and leaf blight); *Colletotrichum truncatum* (antracnosis); *Fusarium semitectum* (seed deterioration); *Aspergillus flavus* (seed deterioration in storage); *Sclerotinia sclerotiorum* (stem and pod white mold); and *Rhizoctonia solani* (seedling blight and dead patches). These pathogens are detected and identified by a specific test (**Sanitary Test or Seed Pathology Test**). The main purpose is to determine the sanitary class of a seed sample. This test is performed at a laboratory which must have the following equipments: growth chambers, binocular stereomicroscope, compound microscope, test boxes (gerbox and plastic or glass Petri dishes), substrate (filter paper), transfer chamber, sterilizing oven, autoclave, and other small tools (forceps, knives, scissors, and transfer loops). Several lab tests may be used to characterize the sanitary class of soybean seeds; The commonly used and internationally recommended is the **filter paper method** or **blotter test** which can detect all

fungi in the tested seeds (internally and externally). Other tests (**deep freezing method** and **agar incubation method**) may be used. Drawings and descriptions of the most important fungi found in soybean seeds are in the appendix.

1. INTRODUÇÃO

A simples indicação das percentagens de pureza e de germinação de um lote de sementes não é suficiente para caracterizar o seu verdadeiro estado fisiológico, pois, nesses testes, além da pureza física, apenas é avaliada a capacidade que a semente possui para formar plântulas normais sob condições ótimas à germinação. Na tentativa de melhor identificar os lotes de sementes de alta qualidade fisiológica, a concepção de vigor vem recebendo grande atenção como mais um parâmetro utilizado para indicar o futuro desempenho dessas sementes no campo. Experiências têm demonstrado que a consideração apenas desses atributos para se atestar a qualidade de sementes tem sido insuficiente, principalmente na atual política agrícola brasileira, onde se exige uma agricultura mais econômica e rentável, assumindo a semente papel decisivo na diminuição de riscos. Nesse contexto, a sanidade de sementes apresenta-se com significativa importância, uma vez que determinados microorganismos, associados a elas, podem constituir-se em fator altamente negativo no estabelecimento inicial de uma lavoura. Dessa forma, fica evidenciado que para se atestar a verdadeira qualidade de um lote de sementes, deve-se, obrigatoriamente, levar em conta o somatório dos atributos físicos, genéticos, fisiológicos e sanitários.

2. SANIDADE

O laboratório de Análise de Sementes tem como função

básica verificar a qualidade das sementes. Esta qualidade não se expressa somente em seu valor genético e estado físico e fisiológico, mas também no aspecto sanitário.

A condição sanitária é extremamente importante se consideramos que as sementes são veículos de agentes fitopatogênicos, que nelas podem se alojar e com elas serem levados ao campo, provocando redução na germinação e vigor e originando focos primários de infecção de doenças.

No controle de qualidade de sementes, a importância do aspecto sanitário vem sendo reconhecida de forma crescente. E, considerando os expressivos avanços da área de patologia de semente, vem crescendo também a necessidade de implantação e credenciamento de laboratórios, para a realização de análises sanitárias.

3. PRINCIPAIS FUNGOS ENCONTRADOS EM SEMENTES DE SOJA

A soja no campo é atacada por um grande número de doenças fúngicas, que podem causar prejuízos tanto no rendimento quanto na qualidade das sementes. Do ponto de vista sanitário, a semente ideal seria aquela livre de qualquer microorganismo indesejável. Entretanto, isso nem sempre é possível, uma vez que a qualidade das sementes é altamente influenciada pelas condições climáticas sob as quais a semente foi produzida e armazenada. Essas, porém, variam de ano para ano, de região para região, assim como para diferentes épocas de semeadura e ciclo da cultura.

A maioria das doenças de importância econômica que ocorre na soja é causada por patógenos que são transmitidos pelas sementes. Isso implica na introdução de doenças em áreas novas ou mesmo a reintrodução em áreas cultivadas nas quais a doença ocorreu um dia e, em função da adoção de práticas eficientes de controle, como, por exemplo, a rotação de culturas, ficou livre da mesma. A transmissão via semente proporciona, na lavoura, uma distribuição ao acaso de focos primários de doenças, sendo que o processo infeccioso geralmente ocorre nos estádios iniciais de desenvolvimento da planta. Além disso, a freqüente introdução de patógenos pelas sementes tende a aumentar a incidência de doenças já existentes numa área.

Até o momento, inúmeros fungos já foram identificados em sementes de soja, porém são poucos os que merecem destaque por serem economicamente importantes, conforme relação a seguir: *Phomopsis* spp. (anamorfo de *Diaporthe* spp.), *Colletotrichum truncatum*, *Fusarium* spp. (principalmente *F. semitectum*), *Sclerotinia sclerotiorum*, *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojina*, *Aspergillus* spp. (principalmente *A. flavus*), *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Chaetomium* sp., *Cladosporium* sp., *Corynespora cassicola*, *Curvularia* sp., *Epicoccum* sp., *Macrophomina phaseolina*, *Monilia* sp., *Mucor* sp., *Periconia* sp., *Peronospora manshurica* (crosta de oosporos), *Phoma* sp., *Pithomyces* sp., *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus stolonifer*,

Septoria glycines, *Sclerotium rolfsii*, *Stemphylium* sp. e *Trichoderma* sp.

3.1. *Phomopsis* spp.

- *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* - Cancro da haste (Northern stem canker)
- *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* - Seca da haste e da vagem
- *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* - Cancro da haste (Southern stem canker)

Esse fungo freqüentemente reduz a qualidade das sementes de soja, especialmente quando ocorrem períodos chuvosos associados com altas temperaturas durante a fase de maturação; é considerado como a principal causa da baixa germinação de sementes de soja, no teste padrão de germinação, à temperatura de 25°C. Trabalhos têm demonstrado que sementes altamente infectadas por *Phomopsis* podem ter sua germinação drasticamente reduzida, quando avaliada pelo teste padrão (rolo de papel toalha a 25°C); porém a emergência das plântulas oriundas de ssas sementes no teste de solo ou areia não é afetada, se a qualidade fisiológica for boa e as condições forem adequadas para rápidas germinação e emergência. Esses resultados podem ser explicados por um mecanismo de escape no qual a plântula, ao emergir, solta o tegumento infectado no solo, ao passo que, no teste padrão de germinação (rolo de papel) o tegumento permanece em contato com os cotilédones, causando sua deterioração. Esses resultados demonstram que o teste padrão de germinação por si só é inadequado para avaliar a qualidade de sementes de soja com alta incidência de *Phomopsis*.

Já foi demonstrado também que *Phomopsis* perde viabilidade rapidamente durante a armazenagem em condição ambiente, ocorrendo, ao mesmo tempo, um aumento gradual

na porcentagem de germinação em laboratório. Este aumento na germinação depende também da qualidade fisiológica da semente. Danos mecânicos, deterioração por umidade e danos por percevejo são freqüentemente responsáveis pela baixa qualidade da semente e, algumas vezes, estão associados com *Phomopsis*. Nestes casos, mesmo que o fungo tenha perdido sua viabilidade durante a armazenagem, a germinação poderá não alcançar o padrão mínimo necessário para a sua comercialização.

Após incubação no teste de sanidade, as sementes infectadas apresentam um micélio denso, branco, floculoso, contendo freqüentemente picnídios escuros, globosos e ostiolados, com formação de exudatos. Muitas vezes pode ocorrer desse fungo produzir apenas picnídios sobre a semente, sem a presença do micélio. Nesses casos, a identificação segura do patógeno deve ser baseada na presença dos esporos alfa e beta. Esses dois tipos de esporos podem ser produzidos, não raramente, no mesmo picnídio (característica da espécie), podendo ocorrer também a produção apenas de esporos alfa ou beta num picnídio.

3.2. *Colletotrichum truncatum* - Antracnose

Esse fungo pode causar deterioração da semente, morte de plântulas e infecção sistêmica em plantas adultas. De maneira geral, a incidência desse patógeno nas sementes é baixa, sendo que dificilmente obtem-se um lote de sementes com níveis elevados de *C. truncatum*. Entretanto, com a expansão da cultura da soja para outras regiões do Brasil, tem-se observado, em algumas safras, aumento considerável da presença desse fungo nas sementes de soja. Com relação à perda de viabilidade desse patógeno nas sementes durante o armazenamento, trabalhos recentes demonstraram que esse fungo é mais persistente que *Phomopsis* spp. e *Fusarium*

semitectum, apesar de sua incidência diminuir quando as sementes são armazenadas em condições ambientes, por um período de seis meses. A principal característica utilizada para a identificação do patógeno nas sementes, após o período de incubação, é a presença de acérvulos típicos da espécie, onde são observadas inúmeras setas escuras.

3.3. *Cercospora kikuchii* - Mancha púrpura

Embora o sintoma característico causado por esse patógeno na semente seja a mancha púrpura, nem todas as sementes infectadas apresentam esta descoloração do tegumento. Trabalhos têm demonstrado não haver nenhum efeito negativo do fungo sobre a qualidade da semente. As sementes infectadas não parecem ser fonte importante de inóculo, a não ser em áreas novas, uma vez que a taxa de transmissão semente-planta-semente é bastante baixa. No teste de sanidade, a presença da coloração púrpura do tegumento facilita a identificação do fungo, bastando observar o crescimento do mesmo e/ou esporulação. Os conídios longos, hialinos e septados são produzidos em fascículos e distinguem-se dos conidióforos que são de cor marrom-escura.

3.4. *Cercospora sojina* - Mancha “olho-de-rã”

As sementes infectadas por esse patógeno podem apresentar coloração cinza esverdeada no tegumento, que, freqüentemente, apresenta rachaduras, porém não causa problemas de qualidade de sementes. A presença desse fungo nas sementes de soja tornou-se esporádica, uma vez que a grande maioria das cultivares recomendadas para plantio são resistentes a essa doença.

A identificação do fungo no teste de sanidade é feita,

observando-se a presença de conidióforos escuros e conídios hialinos, septados, que são as características utilizadas para diferenciar *Cercospora kikuchii* de *C. sojina*, cujos esporos são bem menores.

3.5. *Rhizoctonia solani* - Tombamento e morte em reboleira

A importância do inóculo da semente é duvidosa, porque o fungo ocorre naturalmente no solo. A identificação do fungo no teste de sanidade de semente é feita com base na característica do micélio marrom, onde hifas septadas apresentam ramificação em 90°, já que o mesmo não produz esporos.

3.6. *Sclerotinia sclerotiorum* - Podridão branca da haste e da vagem

A transmissão por semente pode ocorrer tanto através de micélio dormente (interno) quanto por escleródios misturados às sementes. O fungo, devido à formação de estruturas de resistência (escleródios), é de difícil erradicação após introduzido numa área. No teste de sanidade de sementes usualmente realizado (papel de filtro/23°C/7 dias), dificilmente o fungo é detectado. Para a obtenção de melhores resultados, recomenda-se o uso de temperatura entre 10-15°C e 28 dias de incubação. A identificação é feita com base na presença de micélio branco típico e formação de escleródios.

3.7. *Fusarium semitectum* - Podridão de sementes

Dentre as espécies de *Fusarium*, o mais freqüente (98% ou mais) em sementes de soja é o *F. semitectum*. É

considerado como fungo patogênico, por causar problemas de germinação em laboratório, de maneira semelhante ao *Phomopsis*. O fungo *F. semitectum* está freqüentemente associado a sementes que sofreram atraso de colheita ou deterioração por umidade no campo. O sintoma típico desse fungo em sementes de soja, após período de incubação, é a presença de micélio normalmente branco, porém variando do amarelo-pêssego até o marrom (dependendo da idade da cultura) e com aspecto algodinoso denso. Sob o microscópio estereoscópico (50 aumentos) é possível observar as frutificações típicas do fungo.

3.8. *Aspergillus* spp.

Diversas espécies de *Aspergillus* ocorrem em sementes de soja, porém a mais freqüente é *Aspergillus flavus*. Tem sido observado que, em sementes colhidas com teores elevados de umidade, um retardamento do início da secagem por alguns dias é suficiente para reduzir sua qualidade, devido à ação desse fungo. Quando encontrado em alta incidência, pode reduzir o poder germinativo das sementes.

3.9. *Penicillium* spp.

Este fungo é menos freqüente que *Aspergillus* spp., porém ocorre geralmente em semente de soja de baixa qualidade.

4. TESTES DE SANIDADE DE SEMENTES DE SOJA

4.1. Importância do teste de sanidade

Um teste de sanidade consiste na análise das sementes para detecção e identificação dos patógenos a ela associados. Seu objetivo é determinar o estado sanitário de uma amostra e, conseqüentemente, do lote que representa. As informações obtidas permitem:

- a) evitar a introdução de patógenos em áreas isentas;
- b) prevenir futuros prejuízos devido ao aparecimento e desenvolvimento de doenças no campo;
- c) racionalizar o tratamento das sementes-escolha do fungicida adequado a ser utilizado;
- d) comparar a qualidade de diferentes lotes, complementando os testes fisiológicos; e
- e) decidir pela eliminação de lotes de sementes altamente contaminados por determinados patógenos.

4.2. Necessidades básicas de um laboratório para análise sanitária de sementes

Há vários equipamentos básicos de um laboratório para análise de patologia de sementes. Na seqüência, serão listadas as instalações e equipamentos mínimos necessários à realização desse tipo de teste.

- a) **Câmaras de incubação**

São unidades fabricadas ou salas adaptadas com controle de temperatura e luz, contendo em seu interior prateleiras, de cerca de 40 cm de altura entre a parte de acomodação das placas/recipientes contendo as sementes. A temperatura deve situar-se entre 20-25°C e o regime luminoso ser de 12 h de luz/12 h de escuro. Para estimular a esporulação dos fungos, as câmaras devem possuir luz com comprimento de onda entre 320 e 420 nm, o qual é conseguido usando-se luz negra (NUV) ou luz fluorescente tipo “luz do dia”.

b) Estereomicroscópio binocular (lupa)

Esse equipamento deve ser dotado de um conjunto de lentes que permita uma ampliação de até 60 vezes, com iluminação artificial.

c) Microscópio composto binocular

Deverá permitir alto poder de resolução (até 1000 vezes), permitindo o exame detalhado do microorganismo envolvido.

d) Recipientes

As sementes podem ser incubadas em vários tipos de recipientes. Placas de Petri de plástico transparente, de vidro borossilicato ou de vidro pirex e caixas plásticas transparentes de germinação (gerbox) podem ser usadas, uma vez que esses materiais permitem a passagem de luz com o comprimento de onda necessário. Os gerbox inicialmente são lavados com água e detergente e, posteriormente, esterilizados com hipoclorito de sódio a 1,5%.

e) Substrato

Deve ser usado papel de filtro qualitativo ou quantitativo, perfeitamente limpos e esterilizados. Normalmente, são colocadas três folhas de papel de filtro/recipiente (placas de Petri ou gerbox).

f) Capela de fluxo laminar

É um equipamento capaz de criar ambiente estéril, sendo composto por filtros absolutos, de 99,97% de eficiência para partículas de 0,3 microns. Esse equipamento é utilizado para a montagem/instalação dos testes de sanidade de sementes.

g) Estufa para esterilização (fornos Pasteur)

Placas de Petri, tubos de ensaio, erlenmeyers e demais vidrarias devem ser esterilizados em calor seco (150-170°C) por duas horas, utilizando esse tipo de equipamento. As placas de Petri devem ser embrulhadas em papel antes de serem colocadas no forno e só desembulhadas no momento da utilização. O papel de filtro também deve ser embrulhado em sacos de papel comum e esterilizados por 4 h a 120°C.

h) Autoclave

Esse equipamento é utilizado para esterilização por meio de calor úmido. São esterilizados em autoclave: vidrarias em geral e meios de cultura contidos em erlenmeyers ou em tubos de ensaio vedados com tampões de algodão, por 15-20 minutos, a 121°C e pressão de 1,5 ATM.

i) Outros utensílios

Todo o instrumental (pinças, bisturis, estiletes, tesouras, alças de platina, etc) deve ser primeiramente lavado com álcool 70% e posteriormente flambado em chama de bico de Bunsen ou lamparina a álcool. Lâminas, lamínulas e fita adesiva durex também são utilizados em um laboratório de patologia de sementes.

4.3. Métodos de detecção de patógenos em sementes de soja

Existem vários testes de laboratório que podem ser utilizados para caracterizar o estado sanitário das sementes de soja, sendo que a seleção de um método em particular dependerá do patógeno a ser detectado, da espécie de semente e do próprio objetivo do teste.

O principal método utilizado na análise sanitária de sementes de soja é o papel de filtro (“blotter”). A experiência tem comprovado que este método é perfeitamente viável e o mais eficaz para a cultura. Em casos específicos, o método pode ser alterado, variando-se a temperatura e o período de incubação para detectar patógenos como *Sclerotinia sclerotiorum*, por exemplo. A seguir, esses métodos serão descritos, detalhadamente.

a) Método do papel de filtro (“blotter test”)

Este método consiste na utilização de sementes, sem assepsia superficial, semeadas em placas de Petri ou caixas Gerbox, contendo três folhas de papel de filtro previamente esterilizadas, embebidas numa solução de 2,4-D (2,4 - dicloro-fenóxiacetato de sódio), a 0,02% do produto comercial (1.000

ml de água destilada esterilizada + 2 ml do herbicida 2,4-D) e em ágar diluído (10 g de ágar/1.000 ml de água) para facilitar a fixação das sementes no substrato. As sementes são dispostas em número de 20, por recipiente.

Em seguida, os recipientes contendo as sementes são incubados em ambiente controlado, com temperatura entre 22 e 26°C, sob regime de 12 h de luz (negra “NUV” e/ou branca fluorescente tipo “luz do dia”)/12 h de escuro. O objetivo da utilização da luz é o de estimular a esporulação da maioria dos fungos. Após um período de incubação de sete dias, as sementes são examinadas, uma a uma, sob microscópio estereoscópico e os microorganismos são identificados e anotados. A identificação é feita com base na esporulação dos fungos.

Para cada amostra recomenda-se a utilização de 200 a 400 sementes, que devem ser tomadas ao acaso. O resultado do teste é expresso em percentagem de cada fungo detectado.

A utilização do 2,4-D tem por finalidade inibir a germinação das sementes, a fim de facilitar a leitura do teste. Este tratamento leva à morte do embrião, sem causar efeito negativo na flora fitopatogênica.

b) Método do papel de filtro com congelamento (“deep freezing method”)

Este método consiste em pequena variação do anterior, no qual elimina-se a germinação, não pelo uso do 2,4-D, mas pela exposição das sementes à temperatura de -20°C.

As sementes de soja são semeadas em placas de Petri ou caixas gerbox contendo três folhas de papel de filtro previamente esterilizadas e embebidas em ágar diluído (10 g de ágar/1.000 ml de água). Em seguida, são incubadas, sob as mesmas condições já descritas no teste anterior, nas primeiras

24 horas. Após esse período, os recipientes são retirados e colocados em um freezer a -20°C , por 24 horas. Posteriormente, voltam ao ambiente normal de incubação por cinco dias, perfazendo assim os sete dias, quando então é realizada a avaliação.

O choque de frio, após as sementes absorverem água nas primeiras 24 horas de incubação, prejudica a germinação normal. Os microorganismos desenvolvem-se normalmente durante a incubação e a avaliação fica facilitada, uma vez que não ocorre a germinação das sementes.

c) Método de incubação em ágar

Neste tipo de teste, inicialmente as sementes necessitam sofrer assepsia superficial com solução de hipoclorito de sódio 1,5% (água sanitária, por ex., Q.boa); 2:1 v/v (duas partes de água e uma parte do produto comercial). Para isso, submergem-se as sementes na solução por cinco minutos. Esse processo tem por finalidade eliminar microorganismos presentes na superfície das sementes, sem afetar os patógenos localizados internamente.

As sementes, em número de dez, são distribuídas em placas de Petri, contendo 10 ml do meio BDA (200 g de extrato de batata; 20 g de dextrose; 12 g de ágar e água destilada). A esse meio, antes da autoclavagem, adiciona-se 2,4-D a 0,02%. As placas com as sementes são incubadas em ambiente controlado, sob as mesmas condições descritas no item "a". Após um período de sete dias, a avaliação é realizada baseando-se nas características das colônias que se desenvolvem sobre o meio de cultura.

5. TRATAMENTO DE SEMENTES DE SOJA COM FUNGICIDAS

Nem sempre a semeadura é realizada em condições ideais, o que resulta em sérios problemas de emergência, havendo, muitas vezes, a necessidade de replantio, que acarreta enormes prejuízos ao produtor. Por essa razão, o tratamento de sementes com fungicidas (Tabela 1) vem sendo utilizado por um número cada vez maior de produtores, para garantir populações adequadas de plantas. O objetivo principal desse tratamento é erradicar ou reduzir, aos mais baixos níveis possíveis, o inóculo transportado por elas. É importante ressaltar que o tratamento não visa o aumento da viabilidade da sementes. Se a baixa germinação for causada por danos mecânicos, os fungicidas não demonstrarão qualquer efeito. Por outro lado, se a baixa germinação ou emergência for causada por fungos presentes nas sementes, o tratamento proporcionará incrementos nesses parâmetros. O tratamento é recomendado quando as sementes a serem utilizadas para a semeadura estiverem contaminadas por fungos (o que se determina através de teste de sanidade) e para proporcionar proteção parcial contra patógenos de solo e da própria semente, quando as condições para uma rápida germinação e emergência forem

desfavoráveis, tais como déficit hídrico e condições de plantio em solos com baixa temperatura e/ou alto teor de umidade. O tratamento de sementes apresenta as seguintes vantagens:

- relação custo/benefício favorável - no caso da soja, representa menos de 0,5% do custo total de produção da lavoura;
- é eficiente na fase inicial do desenvolvimento da cultura.;
- é de fácil execução; e
- é seguro ao homem e ao meio ambiente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3.ed. Minneapolis: Burgess, 1972. 241p.
- FRANÇA NETO, J. de B.; HENNING, A.A. **DIACOM**: diagnóstico completo da qualidade da semente de soja. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1992. 22p. (EMBRAPA-CNPSO. Circular Técnica, 10).
- FRANÇA NETO, J. de B.; HENNING, A.A. **Qualidades fisiológica e sanitária de sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1984. 39p. (EMBRAPA-CNPSO. Circular Técnica, 9).
- GOULART, A.C.P. **Avaliação do nível de ocorrência e efeitos de *Phomopsis* sp. e *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Lavras: ESAL, 1984. 80p. Tese Mestrado.
- GOULART, A.C.P. Eficiência do tratamento químico de sementes de soja no controle de *Colletotrichum dematium* var. *truncatum*. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.13, n.1, p.1-4, 1991.
- GOULART, A.C.P.; FRANCISCHELLI, R.A.; SANTINI, A. Avaliação de fungicidas para tratamento de sementes de soja (*Glycine max*). **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.16, n.1, p.9, 1990. Resumo.
- GOULART, A.C.P.; MACHADO, J. da C.; VIEIRA, M. das G.G.C.; PITTIS, J.E. Desenvolvimento inicial da soja (*Glycine max*) a partir de sementes portadoras de

Phomopsis sp. em casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.15, n.1, p.99-101, 1990.

GOULART, A.C.P.; PAIVA, F. de A.; ANDRADE, P.J.M.
Controle de fungos em sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) pelo tratamento com fungicidas. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 16., 1994, Dourados. **Ata e resumos**. Dourados: EMBRAPA-CPAO, 1994. p.125. (EMBRAPA-CPAO. Documentos, 3).

GOULART, A.C.P.; PAIVA, F. de A.; ANDRADE, P.J.M.
Qualidade sanitária de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) produzidas no Mato Grosso do Sul. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 16., 1994, Dourados. **Ata e resumos**. Dourados: EMBRAPA-CPAO, 1994. p.131-132. (EMBRAPA-CPAO. Documentos, 3).

HENNING, A.A. **Patologia de sementes**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1994. 43p. (EMBRAPA-CNPSo. Documentos, 90).

HENNING, A.A. Testes de sanidade de sementes de soja. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V. da S., ed. **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill/ABRATES-COPASEM, 1987. p. 441-454.

HENNING, A.A.; FRANÇA NETO, J.B. Control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary and *Alternaria* spp., in sunflower seeds. In: INTERNATIONAL SUNFLOWER

CONFERENCE, 11., 1985, Mar del Plata. **Proceedings.**
Mar del Plata: [s.n.], 1985. p.475-478.

HENNING, A.A.; FRANÇA NETO, J. de B. Problemas na
avaliação da germinação de sementes de soja com alta
incidência de *Phomopsis* sp. **Revista Brasileira de
Sementes**, Brasília, v.2, n.3, p.9-22, 1980.

HENNING, A.A.; FRANÇA NETO, J.B.; COSTA, N.P. da.
Avaliação dos efeitos de diferentes níveis de sementes com
mancha púrpura, sobre a qualidade fisiológica e sanitária
das sementes. In: EMBRAPA. Centro Nacional de
Pesquisa de Soja (Londrina, PR). **Resultados de
pesquisa de soja 1980/81.** Londrina: 1981. p.290-294.

HENNING, A.A.; FRANÇA NETO, J.B.; COSTA, N.P. Efeito da
época do tratamento químico e/ou período de
armazenamento sobre a qualidade fisiológica e sanitária
das sementes de soja, cv. Bossier e Paraná, com altos
índices de *Phomopsis* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO
DE SEMENTES, 2., 1981, Recife. **Resumos...** Brasília:
ABRATES, 1981. p.24.

HENNING, A.A.; MATSUDA, J.M. Efeito do ambiente e do
período de armazenamento sobre a viabilidade de
Colletotrichum truncatum em sementes de soja.
Informativo ABRATES, Londrina, v.3, n.3, p.101, 1993.
Resumo.

LUCCA FILHO, O.A. Metodologia dos testes de sanidade de
sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V. da S., ed.
Patologia de sementes. Campinas: Fundação
Cargill/ABRATES-COPASEM, 1987. p.276-298.

- MACHADO, J. da C. **Patologia de sementes**: fundamentos e aplicações. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE, 1988. 106p.
- MORAES, S.A. de; SOAVE, J. Fungos em sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V. da S., ed. **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill/ABRATES-COPASEM, 1987. p.18-67.
- MORAES, S.R., MELCHIADES, A.R. **Apostila do laboratório de patologia de sementes**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, [1991?]. 46p.
- NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: MacMillan, 1979. v.1, 839p.
- RICHARDSON, M.J. **An annotated list of seed-borne diseases**. 3.ed. [S.I.]: CAB/CMI/ISTA, 1979. 320p.
- RICHARDSON, M.J. **Suplement I to an annotated list of seed-borne diseases**. 3.ed. [S.I.]: CAB/CMI/ISTA, 1981. 78p.
- SHERWIN, H.S.; KREITLOW, K.W. Discoloration of soybean seeds by the frog-eye fungus *Cercospora sojina*. **Phytopathology**, v.42, n.10, p.568-572, 1952.
- SINCLAIR, J.B., ed. **Compendium of soybean diseases**. 2.ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1982. 104p.
- TANAKA, M.A.S. Técnicas auxiliares em laboratório de patologia de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V. da S., ed. **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill/ABRATES-COPASEM, 1987. p.313-328.

TIFFANY, L.M. Delayed sporulation of *Colletotrichum* on soybean. **Phytopathology**, v.41, p.975-985, 1951.

VIEIRA, M. das G.G.C. Aspectos de integração, tecnologia e sanidade em estudos de sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 3., 1988, Lavras. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1988. p.48-57.

6. ANEXO

Fonte: Barnett & Hunter (1972)
Moraes & Soave (1987)
Moraes & Melchiades (1991)

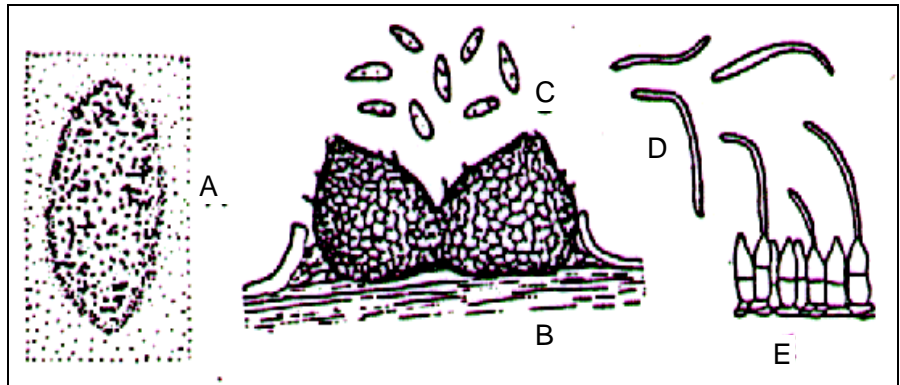


FIG. 1. *Phomopsis* sp. (SACC) - picnídios escuros, ostiolados, imersos no início, quase globosos; conidióforos simples; conídios hialinos, unicelulados, de dois tipos: ovóide para fusóide (conídio α) ou filiforme, curvado (conídio β). Estágio imperfeito do *Diaporthe* sp.

(A) picnídios; (B) dois picnídios; (C) conídios α ; (D) conídios β ; (E) conidióforos. Ordem: Sphaeropsidales.

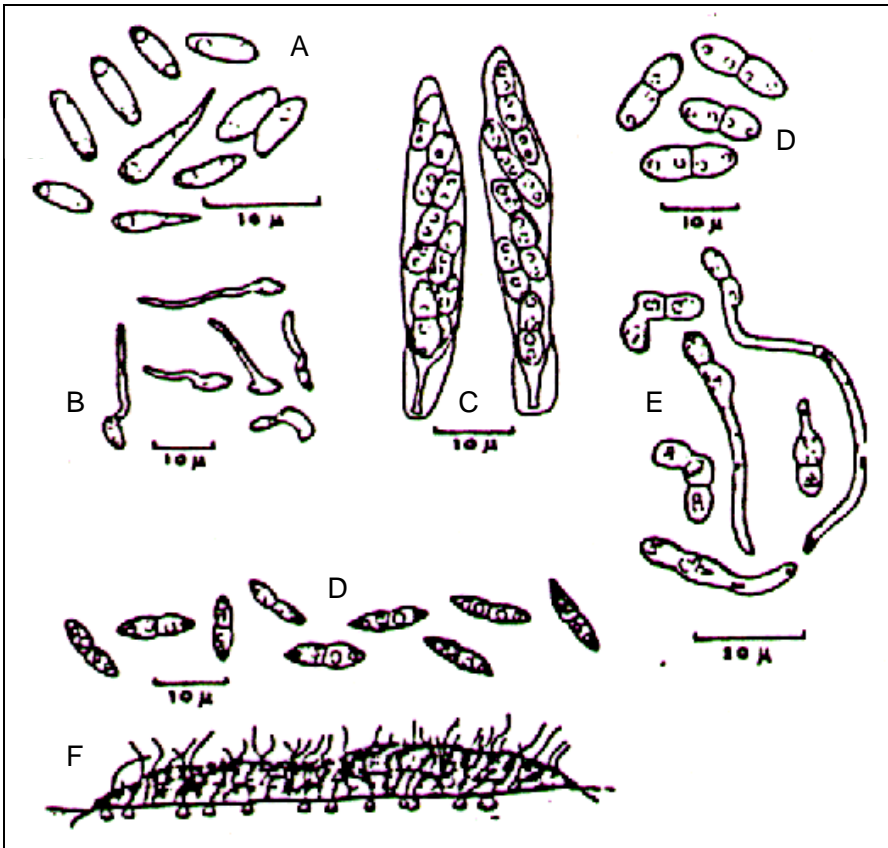
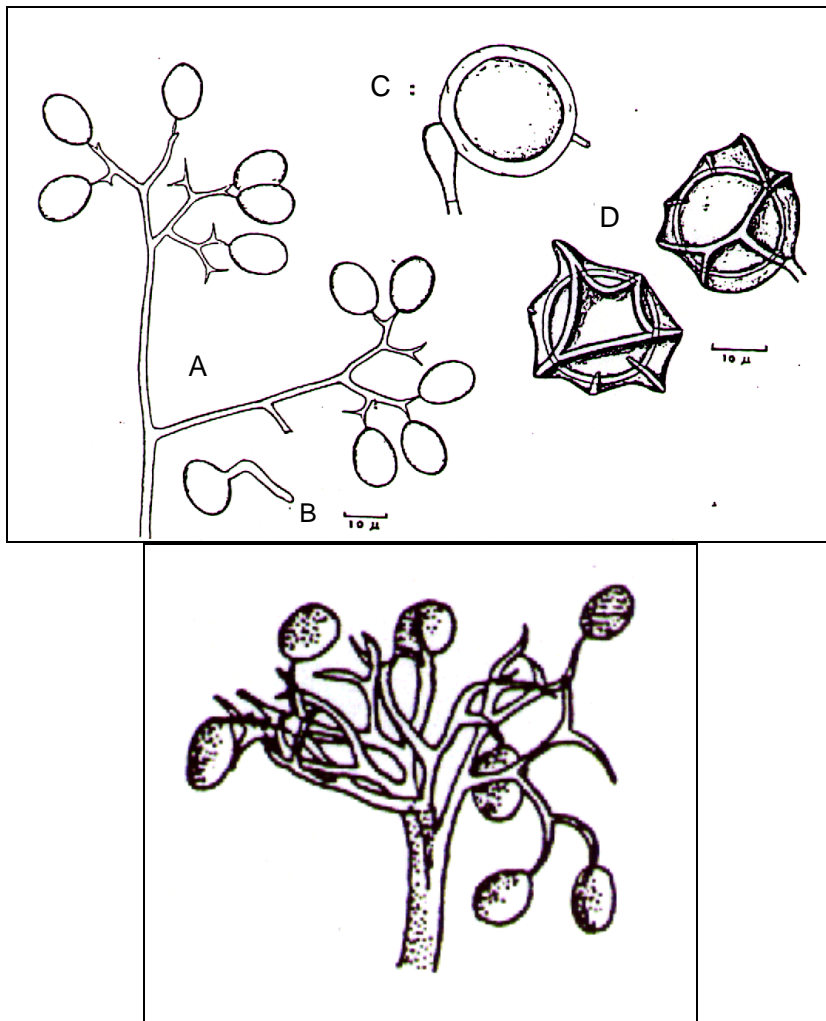


FIG. 2. *Diaphorte phaseolorum* - (A) conídios; (B) conídios germinando; (C) duas ascas contendo ascosporos; (D) ascosporos; (E) ascosporos germinando; (F) corte de um peritécio. Ordem: Sphaeriales.

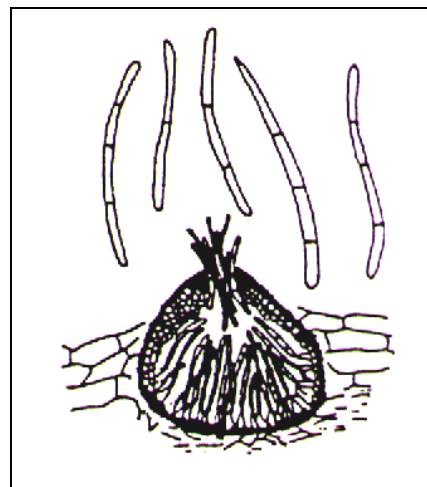
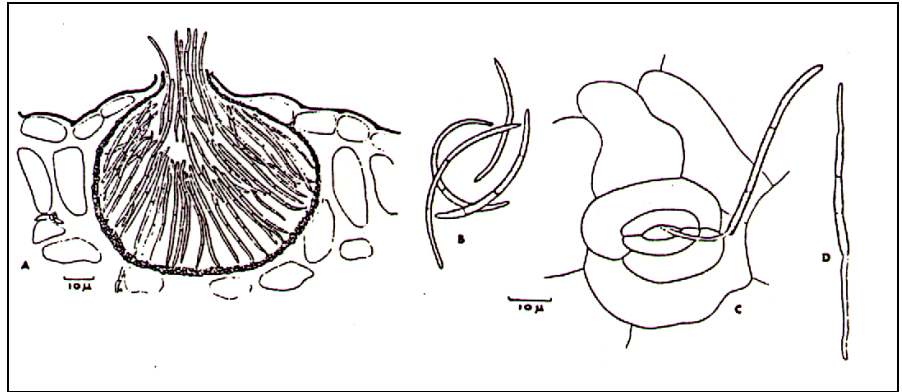
Características de *Diaporthe* spp. e *Phomopsis* spp. em cultura de B.D.A.

Espécies	Característica				
	Cor do micélio	Presença de estroma preto	Tipo de picnídio	Tipos de picnidiosporos	Localização do peritécio
<i>D. phaseolorum</i> var. <i>caulivora</i>	Branco, a cor não muda com a idade (14-21 dias)	Ausente	Não é freqüente; ponta pequena; usualmente estéril	Esporos raros	Produzido em grupos em tufo de micélio
<i>D. phaseolorum</i> var. <i>sojae</i>	Branco no início; laranja para rosa ou escuro com a idade (30 dias)	Pequeno; medianamente e espalhado	Sozinho; com ponta pequena	α e β	Produzido sozinho em torno da base do picnídio, no estroma
<i>Phomopsis</i> spp.	Branco no início; a maioria dos isolados se torna verde-amarelado para mar-rom com a idade (14 a 21 dias)	Extenso, grandemente espalhado	Multirepartido, ponta grande	Somente α	Ausente



PERONOSPORA

FIG. 3. *Peronospora manshurica* é o agente causal do míldio. (A) Esporangióforo com esporângios; (B) esporângio germinando; (C) um anterídeo em contato com um oogônio; (D) oosporos maduros envolvidos pela parede oogonial em colapso. Ordem: Peronosporales.



SEPTORIA

FIG. 4. *Septoria glycines* - (A) corte vertical de um picnídio; (B) conídios; (C) germinação de um conídio; (D) conídio germinando em ambas as extremidades. Ordem: Sphaeropsidales.

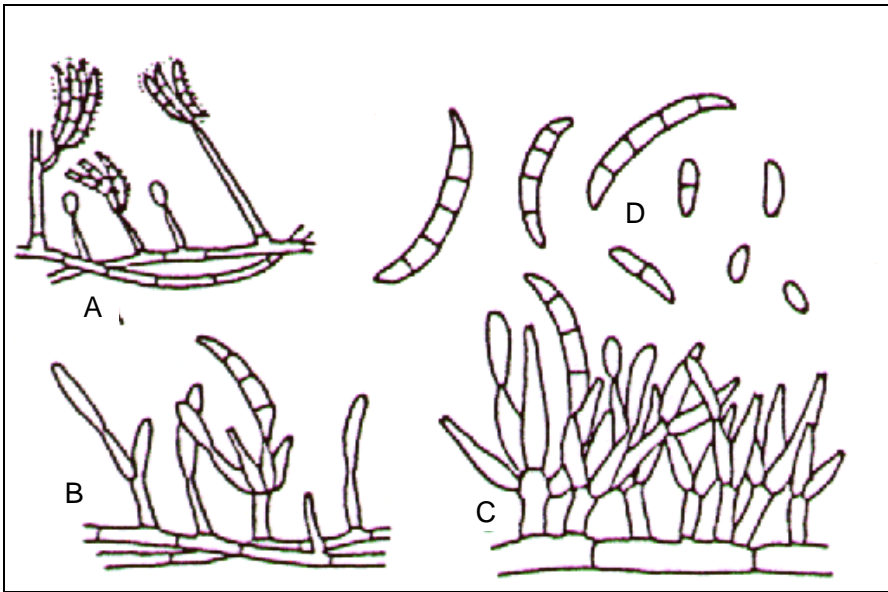


FIG. 5. *Fusarium* sp. (LINK) - micélio algodinoso, freqüentemente com alguma coloração rosa, avermelhada ou amarelada; conidióforos variáveis, finos, simples ou fortes, pequenos, septados irregularmente ou produzindo um espiral de fiálides, sozinho ou agrupados no esporodóquio; conídios (fialosporos), hialinos, variáveis, principalmente de dois tipos, freqüentemente seguros em pequenos agrupamentos; macroconídios pluricelulados, ligeiramente curvos nas pontas como meias-luas; microconídios unicelulados, ovóides ou oblongos, nascidos separados ou em cadeias, intermediários de conídios; conídios bi ou tricelulados, curvados ligeiramente, produzidos em conidióforos nas hifas (micélio) ou agregados (massas, pionnotes). (A) Hifas com conidióforos; (B) conidióforos variados; (C) um esporodóquio formado por conidióforos ramificados; (D) conídios. Ordem: Moniliales.

Algumas espécies mais comuns de *Fusarium* sp.

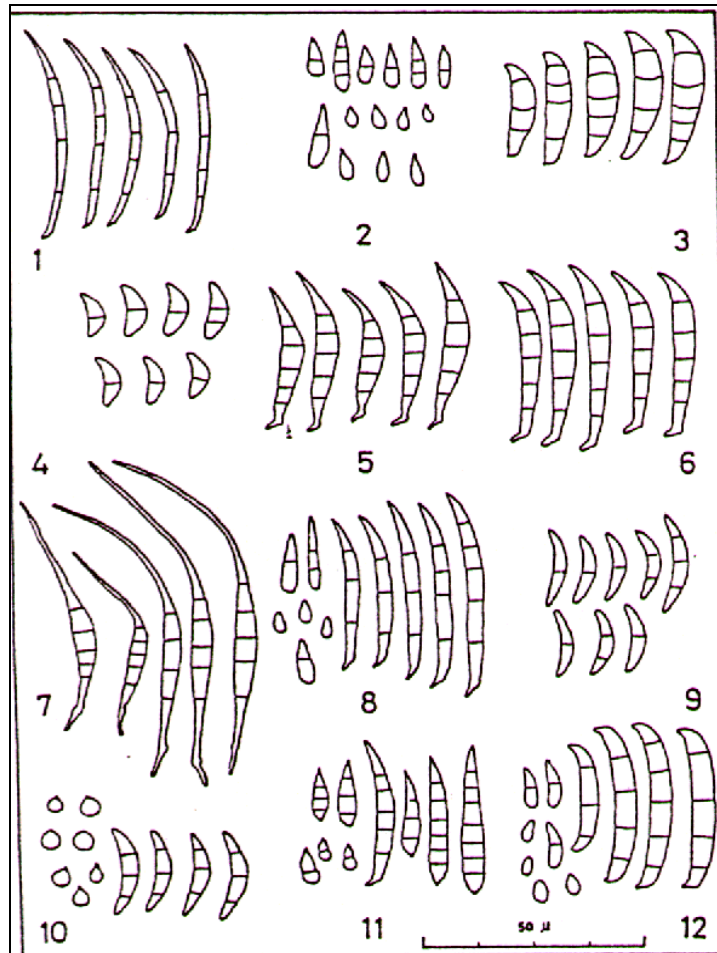


FIG. 6 1. *F. avenaceum*; 2. *F. chlamydosporum*; 3. *F. culmorum*; 4. *F. dimerum*; 5. *F. equiseti*; 6. *F. graminearum*; 7. *F. longipes*; 8. *F. moniforme*; 9. *F. nivale*; 10. *F. poae*; 11. *F. semitectum*; 12. *F. solani*.

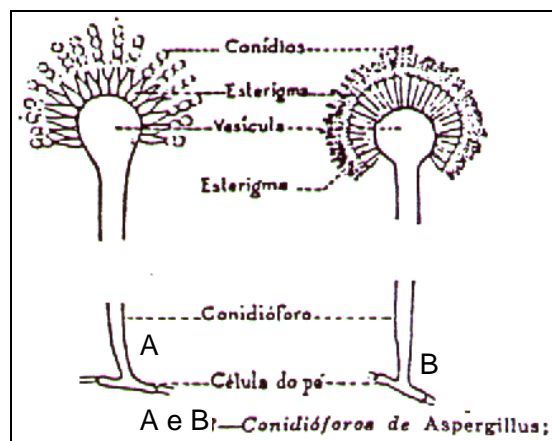
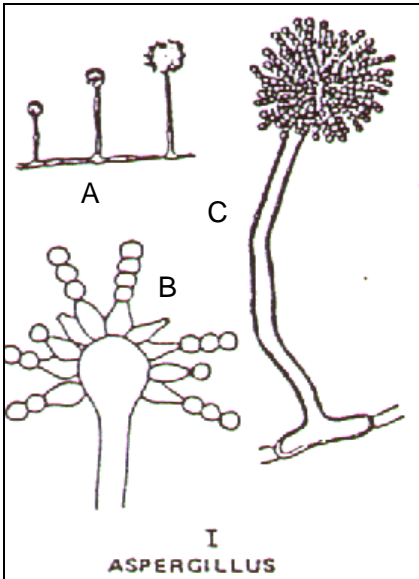
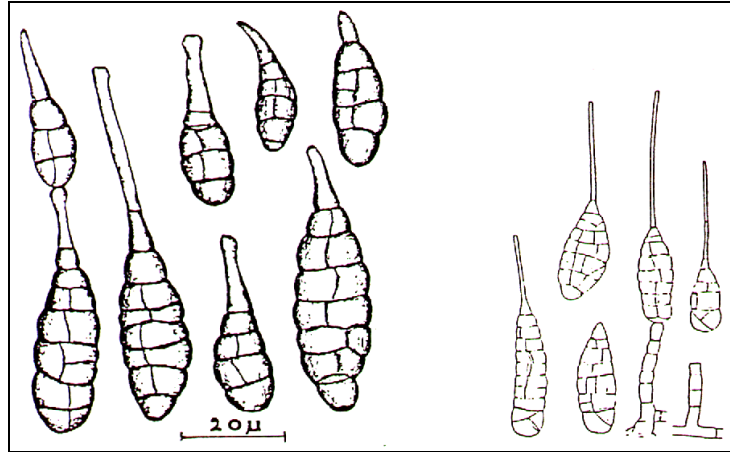
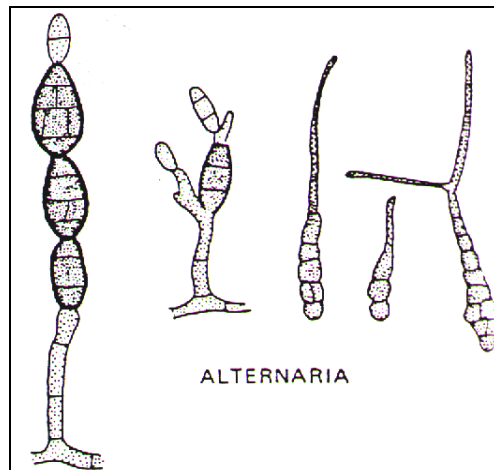


FIG. 7. *Aspergillus* sp. (LINK) - conidióforo único, simples, terminando em vesícula produzindo fiálides, conídios (fialosporos) unicelulados globosos, formando cadeias, com variadas cores

dependendo da espécie. (A) hábito em cultura; (B, C) conidióforos com conídios. Ordem: Moniliales.



Alternaria tenuissima (Nees) - conídios



Alternaria zinniae (Nees) conídios e conidióforos

FIG. 8. *Alternaria* sp. (Nees) - conidióforos escuros, pequenos e alongados, septados, produzindo, tipicamente, uma longa

cadeia seccionada de conídios; conídios caudatos, escuros, com septos longitudinais e transversais (muriformes). Ordem: Moniliales.

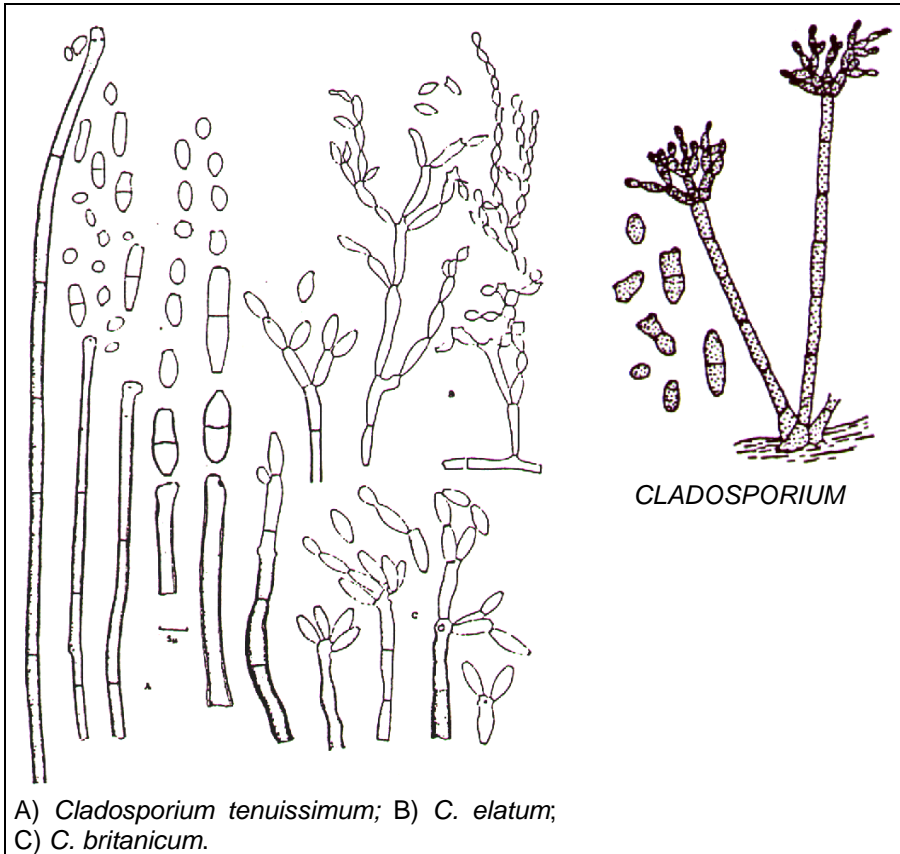


FIG. 9. *Cladosporium* (LINK) - conidióforos longos, retos, escuros, septados, arborescentes, muito ramificados; conídios (blatosporos) escuros, unicelulados ou bicelulados, variáveis em forma e tamanho, ovóides para cilíndricos e irregulares, alguns com a forma típica de limão. Ordem: Moniliales.

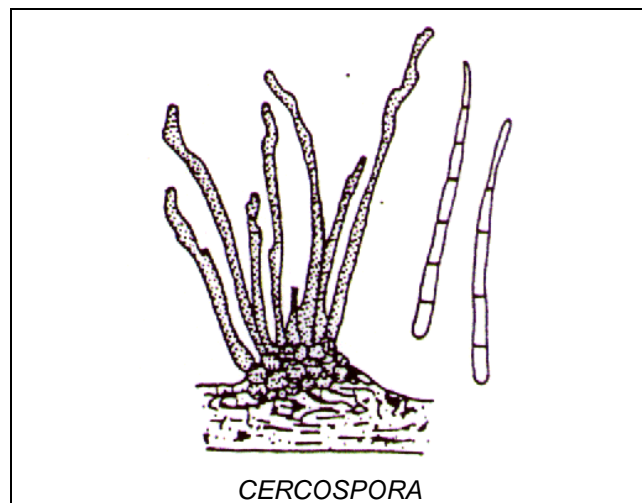
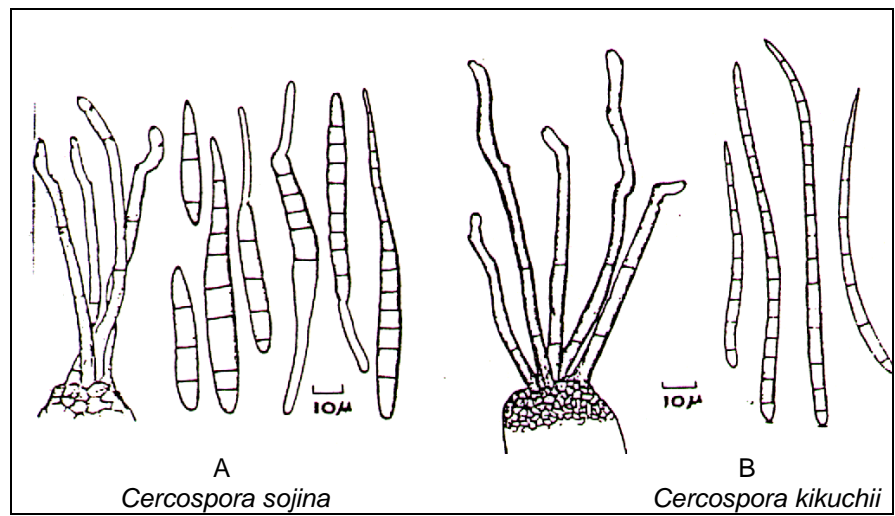


FIG. 10. (A) conidióforos e conídios de *Cercospora sojae*; três conídios estão germinando; (B) conidióforos e conídios de

Cercospora kikuchii. Ordem: Moniliales.

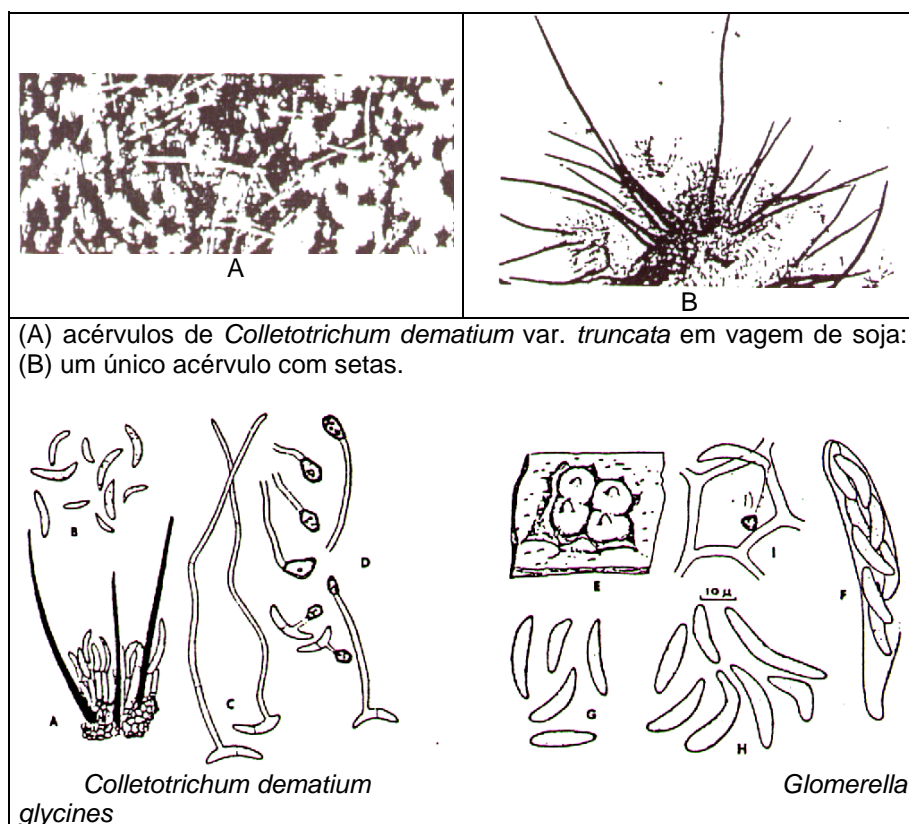


FIG. 11. (A, D) *Colletotrichum dematium* var. *truncata*. (A) acérvulo com conidióforos, conídios e setas; (B) conídios; (C) conídios germinando em água; (D) apressório se formando em água; (E, I) *Glomerella glycines* (fase perfeita do *Colletotrichum* sp.); (E) quatro peritécios imersos no estroma; (F) asca contendo oito ascosporos; (G) ascosporos; (H) ascosporos de cultura artificial; (I) germinação de conídio e penetração na parede da vagem da soja por uma hifa, 48 horas após inoculação. Ordem de *Colletotrichum dematium*: Melanconiales. Ordem da *Glomerella glycines*: Sphaeriales.

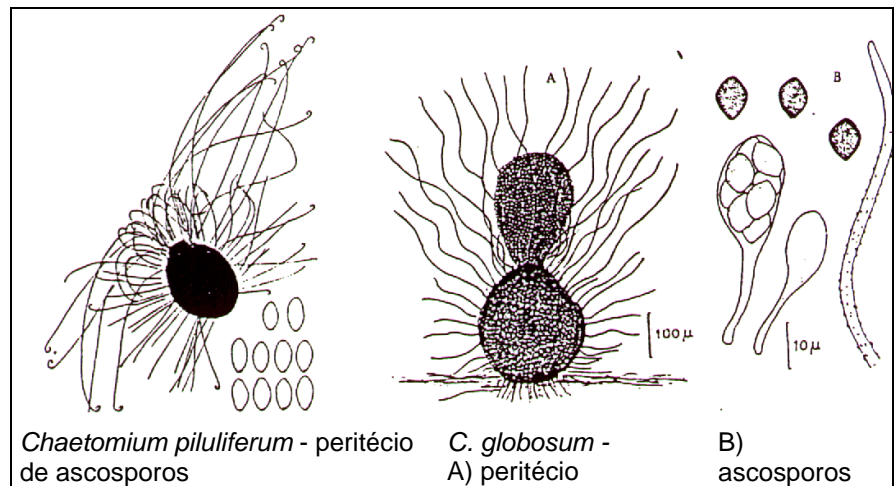
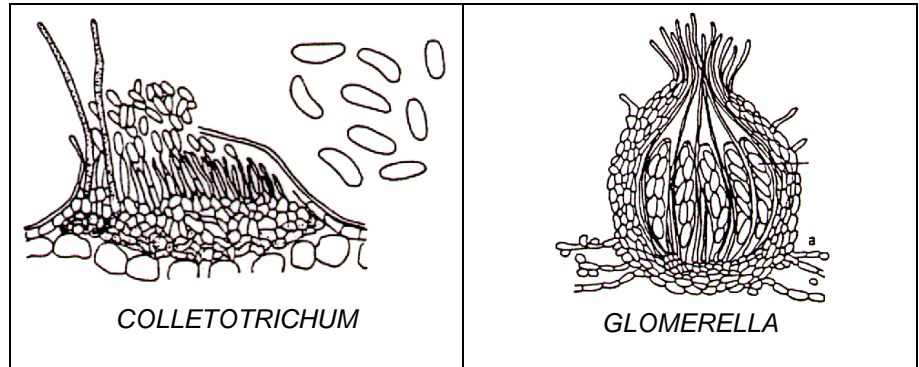


FIG. 12. *Chaetomium* sp. - peritécios superficiais, ovóides, de coloração escura, isolados ou aglomerados, recobertos por numerosas setas escuras, não ramificadas; ostíolo circular bem definido na parte apical do peritécio, este com parede formada por células poliédricas; ascas cilíndricas, de parede evanescente, com dois, seis ou oito ascosporos contínuos,

limoniformes, com membrana lisa e delgada. Ordem:
Sphaeriales.

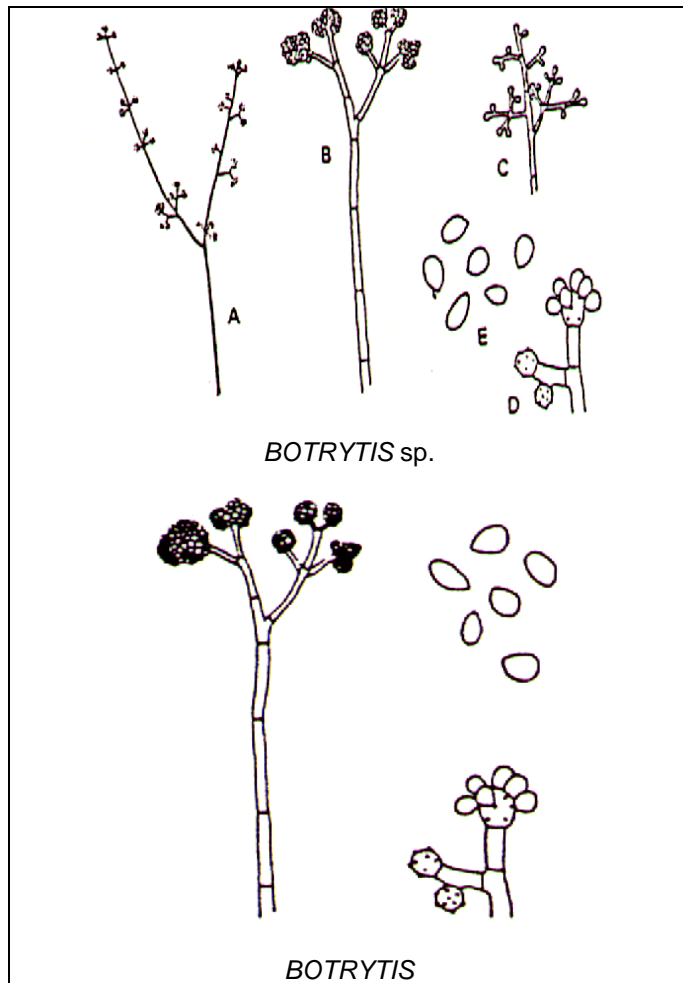


FIG. 13. *Botrytis* (PERS) - conidióforos longos, finos, hialinos ou pigmentados, septados, as células apicais arredondadas, produzindo cachos de conídios num pequeno esterígio; conídios (botryoblastosporos) hialinos ou acinzentados, cinzentos na massa, unicelulares, ovóides; esclerócios pretos e irregulares freqüentemente são produzidos; (A, B) conidióforos e conídios; (C, D) vista do ápice dos conidióforos;

(E) conídios. Ordem: Moniliales.