ESPORULAÇÃO DE *Macrophomina Phaseolina* (Tass.) Goid. E VIABILIDADE DO MÉTODO DE
INOCULAÇÃO DE ESPOROS EM ESTUDOS DE SELEÇÃO DE GERMOPLASMA RESISTENTE

CARLOS CAIO MACHADO

Orientador: HIROSHI KIMATI

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz" da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho, 1980

À memória de meus pais

C A R L O S N I N O e N O Ê M I A

e aos meus irmãos

M A R I A, A L F E U e N O R A

D E D I C O

A G R A D E C I M E N T O S

O autor expressa sinceros agradecimentos:

Ao Instituto de Pesquisas Agronômicas - IPAGRO, da Secretaria da Agricultura do Estado do Rio Grande do Sul, à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA e ao Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", U.S.P., pela oportunidade;

Ao Professor Doutor HIROSHI KIMATI, pela orientação, pela revisão dos manuscritos e pelas sugestões;

Ao Professor Doutor ARMANDO BERGAMIN FILHO, pela revisão dos manuscritos e sugestões;

À OSVALDO MOREIRA DA SILVA pela dedicação, apoio e amizade;

Aos colegas JOSÉ FRANCISCO FERRAZ DE TOLEDO e RENATO CEZAR DITTRICH, pelo auxílio na realização das análises estatísticas;

Aos colegas EMÍDIO RIZZO BONATO, MILTON KASTER, HELENITA ANTONIO, ADEMIR ASSIS HENNING, ROMEU AFONSO SOUZA KIIHL, DIONIZIO LUIZ PIZZA GAZZIERO e ANTONIO LUIZ CERDEIRA, pelo estímulo e sugestões;

À SOFIA AKEMI SIRAISSI, pelo trabalho de datilografia;

Ao colega JORGE YAMASHITA, pelo excelente trabalho fotográ
fico;

Aos colegas e professores do Curso de Fitopatologia pelo
companheirismo, pelo constante apoio e pela amizade, e

A todos que, de uma maneira ou outra, colaboraram para que
este trabalho fosse realizado.

ÍNDICE

	Página
1. RESUMO	01
2. INTRODUÇÃO	04
3. REVISÃO DE LITERATURA	06
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1. Experimento 1. Influência de meios de cultura e superpo sição de papel de filtro na esporulação de <i>M. phaseoli</i> <i>na</i>	18
4.2. Experimento 2. Influência da luz na esporulação de <i>M.</i> <i>phaseolina</i>	20
4.3. Experimento 3. Comparação da capacidade de esporulação de cinco isolados de <i>M. phaseolina</i>	21
4.4. Experimento 4. Efeito de repicagem sucessiva, em dois regimes de luz na esporulação de <i>M. phaseolina</i>	21
4.5. Experimento 5. Efeito da concentração de inóculo de <i>M.</i> <i>phaseolina</i> na reação de quatro diferentes hospedeiros .	24
4.6. Experimento 6. Efeito de inoculação cruzada de <i>M. phaseo</i> <i>lina</i> em duas cultivares de quatro diferenes hospedei ros	26
4.7. Experimento 7. Reação de 10 cultivares de soja a <i>M.</i> <i>phaseolina</i>	27
4.8. Análise estatística dos experimentos	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30

5.1. Experimento 1. Influência de meios de cultura e superpo- sição de papel de filtro na esporulação de <i>M. phaseolina</i>	30
5.2. Experimento 2. Influência da luz na esporulação de <i>M.</i> <i>phaseolina</i>	35
5.3. Experimento 3. Comparação da capacidade de esporulação de cinco isolados de <i>M. phaseolina</i>	37
5.4. Experimento 4. Efeito de repicagem sucessiva, em dois regimes de luz na esporulação de <i>M. phaseolina</i>	40
5.5. Experimento 5. Efeito da concentração de inóculo de <i>M.</i> <i>phaseolina</i> na reação de quatro diferentes hospedeiros .	43
5.6. Experimento 6. Efeito de inoculação cruzada de <i>M. phaseo</i> <i>lina</i> em duas cultivares de quatro diferentes hospedei- ros	45
5.7. Experimento 7. Reação de 10 cultivares de soja a <i>M. pha</i> <i>seolina</i>	52
6. CONCLUSÕES	56
7. SUMMARY	58
8. LITERATURA CITADA	60

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Número, hospedeiro, procedência e data de obtenção dos isolados de <i>M. phaseolina</i> estudados	15
Tabela 2. Efeito do meio de cultura e da superposição de papel de filtro na formação de picnídios de um isolado de <i>M. phaseolina</i>	31
Tabela 3. Análise de variância dos dados do experimento 1 . . .	33
Tabela 4. Efeito de três regimes luminosos na formação de picnídios em dois isolados de <i>M. phaseolina</i>	35
Tabela 5. Análise de variância do experimento 2	36
Tabela 6. Variabilidade na capacidade de formação de picnídios de cinco isolados de <i>M. phaseolina</i> cultivados em meio de farinha de soja-ágar com e sem superposição de papel de filtro.	38
Tabela 7. Análise de variância do experimento 3	39
Tabela 8. Efeito de repicagens sucessivas sob dois regimes de luz na formação de picnídios de um isolado de <i>M. phaseolina</i>	41
Tabela 9. Análise de variância do experimento 4	42
Tabela 10. Reação de quatro hospedeiros frente à inoculação de sementes pré-germinadas com diferentes concentrações de esporos de <i>M. phaseolina</i>	43
Tabela 11. Análise de variância do experimento 5	44

Tabela 12. Patogenicidade de quatro isolados de <i>M. phaseolina</i> inoculados em sementes de duas cultivares de quatro diferentes hospedeiros.	46
Tabela 13. Análise de variância do experimento 6	47
Tabela 14. Altura de planta (cm), peso seco (g) e respectivas médias, de duas cultivares de milho e duas cultivares de sorgo, após inoculação com quatro isolados de <i>M. phaseolina</i>	48
Tabela 15. Análise de variância para altura (cm) e peso seco (g) de plantas de duas cultivares de milho e duas cultivares de sorgo.	50
Tabela 16. Capacidade de sobrevivência de cultivares de soja inoculadas com suspensão de esporos de <i>M. phaseolina</i> em sementes.	53
Tabela 17. Análise de variância do experimento 7	54

LISTA DE FIGURAS

Página

- Fig. 1. Picnídios de *M. phaseolina* produzidos em meio de cultura artificial: A) Picnídios com exudação de esporos; B) picnídios sem exudação de esporos. Foto: câmara fotoautomática WILD MKa-5; microscópio estereoscópio WILD M8; filme Ektachrome 135x36 - 64 ASA; iluminação 2 lâmpadas Philips 6V - 15W, com filtro azul. Aumento de 8x. . . . 18
- Fig. 2. Aspecto de uma cultura de *M. phaseolina* em placa de Petri, onde foi colocado uma gota de álcool para facilitar a contagem dos picnídios. Foto: câmara fotoautomática WILD MKa-5, microscópio estereoscópico WILD M8; filme Ektachrome 135x36 - 64 ASA; iluminação 2 lâmpadas Philips 6V - 15W, com filtro azul. Aumento de 3,84x. . 19
- Fig. 3. Representação gráfica do experimento sobre o efeito de seis repicagens sucessivas realizadas com intervalos de sete dias, em um isolado de *M. phaseolina* em dois regimes de luz, onde T = tubos de ensaio, DR = tubo original, R = repicagens, LC = luz contínua e ES = escuro. . . . 23
- Fig. 4. Esporos de *M. phaseolina* iniciando a germinação, ainda agrupados sobre os picnídios. Foto: câmara fotoautomática WILD MKa-5, microscópio estereoscópico WILD M8; filme Ektachrome 135x36 - 64 ASA; iluminação 2 lâmpadas Philips 6V - 15W, com filtro azul. Aumento de 8x. . . 34

1. RESUMO

No presente trabalho estudou-se a influência de alguns fatores ambientes na esporulação de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. A calibração do inóculo, a inoculação cruzada e a reação de 10 cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merr.), frente à inoculação com suspensão de esporos do fungo, foram também estudadas.

No estudo sobre influência de meios de cultura na produção de picnídios, foram testados os meios de farinha de soja-ágar, farinha de aveia-ágar e batata dextrose-ágar (BDA), todos eles com e sem superposição de papel de filtro na superfície dos meios solidificados. O meio de farinha de soja-ágar foi o que induziu a formação de maior número de picnídios férteis. A adição de papel de filtro aumentou a esporulação em todos os meios de cultura testados.

Dos regimes de luz contínua, luz alternada (12 horas de luz x 12 horas de escuro) e escuro contínuo a que foram submetidos dois

isolados do fungo, o regime de luz contínua induziu esporulação em ambos. Em luz alternada apenas um dos isolados esporulou, mas no escuro não houve formação de picnídios em nenhum dos isolados.

Foi determinado que repicagens sucessivas realizadas durante seis semanas, com intervalos de sete dias cada uma, em presença de luz causaram decréscimo na capacidade de esporulação do isolado em estudo. Entretanto, esse efeito não foi detectado quando as repicagens foram feitas em regime de escuro contínuo.

Os resultados obtidos no experimento de calibração de inóculo indicaram que concentrações tão baixas como 1×10^3 esp/ml, quando inoculadas em sementes pré-germinadas são capazes de induzir sintomas em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), sorgo (*Sorghum* spp) e milho (*Zea mays* L.) e que mesmo com concentrações de 1×10^6 esp/ml, ainda ocorrem plantas sobreviventes.

Feijão e soja responderam diferentemente a determinados isolados quando inoculações cruzadas foram feitas em sementes pré-germinadas, demonstrando certa especificidade do fungo.

A inoculação de sementes de milho e sorgo não afetou a sobrevivência, porém causou redução no tamanho e peso seco das plantas. Sugere-se que inoculações com suspensão de esporos em milho e sorgo sejam feitas em plântulas e que em feijão e soja sejam inoculadas as sementes.

Das 10 cultivares de soja estudadas, a cultivar Viçoja foi a que mostrou menor suscetibilidade, seguida pela Santa Rosa. A cultivar Cocker 102 apresentou reação intermediária e a cultivar Cocker 338 foi a mais suscetível. Determinou-se também que o método de inoculação com suspensão de esporos de *Macrophomina phaseolina* é viável para detectar diferenças de reação entre cultivares de soja, podendo ser usado para seleção de resistência varietal nessa espécie.

2. INTRODUÇÃO

A cultura da soja, a partir da década de 70, tem assumido importância econômica altamente significativa, constituindo-se em um dos produtos agrícolas de maior importância na balança de exportação brasileira. Como segundo produtor mundial dessa leguminosa, o Brasil tem presenciado um aumento crescente nas áreas de cultivo, tanto nas regiões consideradas tradicionais como Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo, como nas regiões ditas em expansão, como Mato Grosso do Sul, Sul dos Estados de Mato Grosso, Goiás e Maranhão e Oeste de Minas Gerais e Bahia.

Esse aumento expressivo da área cultivada, tende a proporcionar um aumento gradual na intensidade das principais doenças que afetam a cultura, além de propiciar condições ao aparecimento de novas doenças e ao desenvolvimento de novas raças fisiológicas de patógenos já existentes, pela diversificação de condições climáticas prevalentes nas diversas regiões.

Macrophomina phaseolina (Tass.) Goid., agente causal da podridão preta, é um patógeno que exemplifica muito bem esse fato. De ocorrência esporádica, baixa frequência e pouca intensidade há alguns anos, o fungo causou perdas estimadas entre 40 e 50% em lavouras de soja do Norte e Oeste do Paraná, nas safras 76/77 e 77/78, devido a prolongados períodos de estiagem ocorridos nos meses de janeiro e fevereiro desses anos, prejudicando, principalmente, cultivares de ciclo tardio como Viçoja e Santa Rosa (Ferreira *et alii*, 1979). Além disso, por ser um patógeno favorecido por temperaturas relativamente altas, em torno de 30°C e baixa umidade do solo, torna-se um problema potencial para a agricultura dos cerrados brasileiros, não apenas para a soja como também para outras espécies cultivadas.

Tendo em vista a potencialidade desse patógeno, como causador de severas perdas à agricultura, e a importância da resistência varietal, como eficiente meio de controle de doenças, o presente trabalho objetivou determinar a viabilidade da utilização de suspensão de esporos, como método prático e fácil de detectar diferenças de reação entre cultivares, frente à inoculação artificial controlada.

Devido à falta de dados na literatura sobre a obtenção de abundante esporulação do fungo em meio de cultura artificial, foi também estudada a influência de alguns fatores na esporulação de *M. phaseolina*, com o fim de fornecer informações básicas ao desenvolvimento do trabalho.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Macrophomina phaseolina (Tass.) Goid. é um microorganismo de larga distribuição geográfica, altamente patogênico e polífago, sobre o qual existe uma ampla e complexa literatura onde são relatados trabalhos provenientes das mais diversas regiões do globo. Dentre as culturas econômicas citadas como hospedeiros desse fungo encontram-se soja (*Glycine max* (L.) Merr.), milho (*Zea mays* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), sorgo (*Sorghum* spp), algodão (*Gossypium* spp), girassol (*Helianthus annuus* L.), juta (*Corchorus capsularis* L.), batata (*Solanum tuberosum* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), beterraba (*Beta vulgaris* L.), amendoim (*Arachis hypogaea* L.), quiabo (*Hibiscus esculentus* L.), dendê (*Elaeis guineensis* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* P. Mill), morango (*Fragaria* spp), cacau (*Theobroma cacao* L.) e outras (THIRUMALACHAR, 1953; CHAN e SACKSTON, 1969; FIGUEIREDO *et alii*, 1969; SACKSTON, 1969; WYLLIE e CALVERT, 1969; MENDES *et alii*, 1971).

Em regiões de clima tropical ou temperado quente, este or

ganismo é agente causal de podridões de raízes, caules e frutos de mais de 300 espécies vegetais (GHAFFAR e ZENTMYER, 1968), sendo considerado um dos graves problemas em sementeiras de essências florestais (SMITH, 1969). Tem sido comprovado, por muitos autores, que a combinação de alta temperatura, baixa umidade do solo e plantas próximas à maturação são fatores importantes na ocorrência de epifitias de *M. phaseolina* (MATHUR e SACKSTON, 1963; EDMUNOS, 1964; JOOSTE, 1969). Experimentos realizados em condições controladas comprovaram que temperaturas em torno de 30°C são as ideais para o desenvolvimento do fungo, tanto em meio de cultura como no solo e na planta (NORTON, 1953; MATHUR e SACKSTON, 1963; EDMUNOS, 1964 ; JOOSTE, 1969; WYLLIE e CALVERT, 1969).

Trabalhos mais recentes, realizados nos Estados Unidos (SINCLAIR e GRAY, 1972; WYLLIE, 1974), ressaltam que a importância desse organismo para as culturas de soja e milho vinha, até pouco tempo, sendo negligenciada, pois, ocorrendo próximo ao fim do ciclo dessas culturas, era considerado um problema secundário. Entretanto, afirmam os autores que o fungo pode atacar a soja já aos três dias após o plantio e causar reduções de rendimento de 15 a 20%. Os autores sugerem, ainda, a intensificação dos estudos sobre fisiologia e controle do fungo.

No Brasil, a primeira referência sobre a presença desse patógeno foi feita por BITANCOURT (1935). Até agora, porém, os dados existentes são escassos, tendo sido encontradas poucas publicações sobre o assunto e quase todas se restringindo, praticamente, ao relato de sua ocorrência. O fungo foi encontrado afetando feijoeiros, na região do vale

do São Francisco, na Bahia (ISSA *et alii*, 1964); e também no estado do Paraná (FIGUEIREDO *et alii*, 1969). Em São Paulo, foi apontado como agente causal de tombamento em sementeiras de algodão e citrus, de podridão em hastes de batata (FIGUEIREDO *et alii*, 1969) e do estiolamento do algodoeiro (MENDES *et alii*, 1971). No levantamento de doenças de soja, realizado durante a safra de 1973/74 no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina foi observado que o fungo estava presente em 5% das lavouras das quais se coletaram amostras (LEHMAN *et alii*, 1976).

A nomenclatura desse patógeno tem sido objeto de constantes modificações em vista de seu estágio esclerocial, estéril, e seu estágio picnidial. O estágio esclerocial foi primeiramente denominado *Sclerotium bataticola* Taub. e mais tarde, transferido para o gênero *Rhizoctonia*, como *Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butl. O estágio picnidial foi descrito por MAUBLANC (1905) como *Macrophoma phaseoli* Maubl. Em 1927 ASHBY, trabalhando com materiais de diversas procedências, descreveu-o como *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) Ashby, considerando as denominações de *Sclerotium bataticola* Taub., *Macrophoma corchori* Saw., *Macrophoma Cajanis* Sys. e Butl., *Dothiorella cajani* Sys. e Butl., *Macrophomina philippinensis* Petr., *Rhizoctonia lamellifera* Small, *Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butl. e *Macrophoma sesami* Saw, como sinônimos. Entretanto, segundo THIRUMALACHAR (1953), o estágio picnidial pertence ao gênero *Botryodiplodia* e o fungo deveria então ser descrito como *Botryodiplodia phaseoli* (Maubl.) Thir. Comb. Nov.

GOIDANICH (1974), citado por FIGUEIREDO *et alii* (1969), es

clarece que a denominação *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. tem prioridade sobre *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) Ashby, mas como a literatura havia consagrado o nome dado por Ashby, esta vinha sendo aplicada com maior frequência e somente há bem pouco tempo, a denominação correta passou a ser empregada. HOPKINS conforme citação de ROGER (1953), afirma que *M. phaseoli* deveria ser empregada apenas quando a forma esclerocial estivesse associada à forma picnidial. Esta forma estaria ligada ao ciclo biológico de um ascomiceto, visto que frutificações conidianas do tipo picnidial são desconhecidas entre os basidiomicetos. A denominação *R. bataticola* seria empregada quando fosse encontrada somente a forma esclerocial. Entretanto THIRUMALACHAR (1953) ressalta que, aparentemente, o desenvolvimento ou não do estágio picnidial não é uma característica de importância específica, mas determinada pela disponibilidade de condições nutricionais e ambientes favoráveis.

Os microorganismos apresentam como característica uma grande variabilidade que pode se refletir em sua morfologia, fisiologia ou patogenicidade. Variações na capacidade de utilização de diferentes substratos, temperatura, pH, produção de toxinas ou outros metabólitos, que são manifestações de diferenças fisiológicas dentro de uma população, resultam, às vezes, em variações na patogenicidade dos biótipos. DHINGRA e SINCLAIR (1972) relatam variações entre isolados provenientes de diferentes regiões dos Estados Unidos. Mais tarde, estudando isolados de *M. phaseolina* obtidos separadamente de raízes, hastes, pecíolos, vagens e sementes de uma mesma planta de soja, concluíram que diferiam em tipo de colônia, taxa de crescimento "in vitro", tamanho dos esclerócios e habilida

de de causar lesões em plântulas de soja (DHINGRA e SINCLAIR, 1972b; DHINGRA e SINCLAIR, 1973). Relatam, ainda, que os isolados de raízes foram os mais patogênicos, causando morte de 80 a 100% das plantas inoculadas com ferimento. Resultados semelhantes haviam sido obtidos por KHARE *et alii* (1970), em estudos realizados com isolados obtidos de raízes, hastes, folhas, vagens e sementes de feijão mungo (*Phaseolus mungo* L.). Os autores atribuíram essas variações entre isolados aos diferentes processos bioquímicos nas diversas partes da planta.

THIRUMALACHAR (1955), SMITH (1969) e MEYER *et alii* (1974) citam *M. phaseolina* como fungo de solo. Porém SMITH (1969b), comparando o efeito de inóculo micelial e esclerocial na mortalidade de plântulas de pinheiro (*Pinus lambertiana* Dougl.), sob condições variáveis de solo, classificou-o como habitante de raiz, baseando-se no esquema de GARRET (1956). McCAIN e SMITH (1972) sugeriram ser este organismo primariamente um fungo de raiz e que a forma esclerocial é seu principal meio de sobrevivência e disseminação. O cultivo desse fungo se mostra extremamente fácil em meios nutritivos variados, a partir de esclerócios e esporos. Ambos produzem esclerócios abundantemente, mas quase nunca picnídios. A produção de esclerócios é constante e rápida em cultura pura (2 a 3 dias). A formação de picnídios, embora rara em condições naturais, ocorre de maneira accidental em determinados hospedeiros herbáceos, notadamente amendoim, juta, girassol e feijão (ROGER, 1953). Os esclerócios são, às vezes, considerados como primórdios de picnídios e, talvez, representem realmente um estágio intermediário em seu desenvolvimento (HOFFMASTER e McLAUGHLIN, 1943, ROGER, 1953).

O fungo possui uma vasta gama de hospedeiros, porém seu estágio picnidial tem sido relatado em órgãos específicos de poucas espécies de plantas. THIRUMALACHAR (1953) constatou que picnídios e picnidiosporos, em diferentes hospedeiros, eram morfológicamente semelhantes e que todos os isolados, quando inoculados em hastes de batata, produziam picnídios, após uma semana de incubação, em temperaturas de 28 a 35°C. KULKARNI *et alii* (1962) observaram a formação de picnídios em plantas de algodão com infecção natural e descreveram um método de indução de frutificações do fungo, na zona do colo das plantas, através de inoculação artificial com micélio desenvolvido em meio de cultura. LIKHITE (dados não publicados), citado pelos mesmos autores, obtivera picnídios, incubando raízes de algodão portadoras de esclerócios a 40°C em condições de alta umidade. Em juta, há formação de picnídios nas folhas das plantas afetadas e os esporos, oriundos desses picnídios, sob condições favoráveis, disseminam o patógeno, causando severas perdas à cultura (AHMED e AHMED, 1969). SINGH e CHOCHAN (1972) encontraram o estágio picnidial ocorrendo naturalmente em feijão mungo, juta, batata, milho e crotolaria (*Crotolaria juncea* L.), porém, em cabaça (*Lagenaria vulgaris* Ser), abóbora (*Cucurbita pepo* L.), bucha (*Luffa acutangula* Roxb), melão (*Cucumis melo* L.) e Melancia (*Citrullus lanatus* (Thumb.) Mansf.), houve formação de picnídios somente na superfície dos frutos, após inoculação artificial com ferimento e nenhum dos isolados obtidos desses hospedeiros produziu picnídios em meio de cultura.

Embora sejam encontrados na literatura diversos trabalhos sobre esporulação de *M. phaseolina*, estes, em sua maioria, dizem respeito

à esporulação em planta ou partes de planta e poucos tratam da esporulação em meios de cultura comumente usados em laboratório. Além disso, a maioria dos trabalhos abordam o assunto apenas qualitativamente, não havendo referências de estudos comparativos de esporulação em diferentes meios de cultura de maneira quantitativa. LUTTRELL (1946), em estudos realizados com 58 isolados, verificou que apenas um produzia picnídios em meio de cultura. ASHWORTH (1959), em 35 isolados, encontrou 25 que esporulavam em folhas verdes de plântulas de feijão e sete em folhas estioladas, mas apenas um em BOA. ASHWORTH (1959) e GOTH e OSTAZESKI (1965) observaram que, em BOA, tipos não esporulantes logo predominavam quando linhagens esporulantes eram transferidas em massa por várias gerações. Em trabalho mais recente, MACHADO e KIMATI (1975) relatam a formação de picnídios em meio de farinha de aveia-ágar.

O efeito da luz na esporulação de *M. phaseolina* já foi estudado por diversos autores. ASHWORTH (1959) concluiu que escuridão total inibe a esporulação e que alternância de luz é melhor que luz contínua. GOTH e OSTAZESKI (1965), estudando esporulação em tecidos foliares esterilizados em óxido de propileno, concluíram que todos os isolados esporulavam profusamente sob luz contínua, mas erraticamente no escuro. KNOW-DAVIES (1965) induziu esporulação em vários isolados, cultivando-os em meio de farinha de amendoim-ágar e em papel de filtro impregnado com extrato etéreo de farinha de amendoim, após o tratamento com luz ultravioleta de onda longa. RAD *et alii* (1973) conseguiram produção de picnídios somente quando o fungo era cultivado na luz, em tecidos e extratos de tecidos de quiabo, pimentão e beringela, dependendo ainda da fonte de luz

ou parte da planta. Tratando isolados de *M. phaseolina* com ácidos graxos livres e seus ésteres metílicos provenientes de extratos de amendoim, OOSTHUIZEN e POTGIETER (1974) conseguiram induzir esporulação. Os mesmos autores, comparando a atividade fotoesporogênica de diferentes frações de ácidos graxos mono-insaturados, concluíram que o ácido oleico era o agente responsável pela esporulação. CHIDAMBARAM e MATHUR (1975) induziram produção de picnídios em 20 isolados, cultivando-os em grãos de milho (*Pennisetum typhoides* (Burn.) Stapf and E.C. Hubbard) ou folhas de trigo (*Triticum aestivum* L.) em 1,5% água-ágar, sob ciclos alternados de escuro e luz próximo a ultravioleta. Em trabalho preliminar com quatro isolados, três provenientes de soja e um de feijão, e que em BDA produziam apenas esclerócios, MACHADO e KIMATI (1975) cultivaram o fungo em regime de escuro e luz contínua e observaram que, no escuro, nenhum isolado produziu picnídios e que apenas um dos isolados de soja não frutificou sob luz contínua.

Baseados em caracteres morfológicos da cultura, patogenicidade, características culturais e especificidade a um dado hospedeiro, alguns autores afirmam existir diferentes raças de *M. phaseolina*. Assim, com base em caracteres morfológicos da cultura, THIRUMALACHAR (1953) dividiu a espécie em duas sub-espécies; *typica* e *sesamica*. Entre 19 isolados de *M. phaseolina* provenientes de algodão, baseando-se em características culturais e patogenicidade à três variedades do hospedeiro, SULAIMAN e PATIL (1966) distinguiram 2 raças. Por outro lado, em estudos sobre o crescimento em diferentes meios de cultivo, temperatura, pH e caracteres microscópicos de 8 isolados, AHMED e AHMED (1969) os separaram em oito raças cultu-

rais, apresentando inclusive uma chave dicotômica para diferenciá-los. SINGH e CHOCHAN (1972), fazendo testes de inoculação cruzada em diversas espécies de Cucurbitáceas, encontraram especificidade apenas para abóbora.

A quase totalidade dos trabalhos sobre inoculação, encontrados na literatura, tratam de inoculação de solo ou de plantas com suspensão de esclerócios ou micélio. Apenas duas citações se referem a inoculações com suspensão de esporos. LUTTRELL (1946) foi o primeiro a inocular plantas de feijão, em diversos estádios de desenvolvimento, colocando gotas de suspensão de esporos em hastes e folhas, sem provocar qualquer tipo de ferimento. As plantas assim inoculadas foram mantidas em câmara úmida por 48 horas e posteriormente levadas para casa de vegetação. No intervalo de duas semanas, ocorreu o aparecimento de lesões nas hastes e folhas inoculadas, que, evoluindo, culminaram com a morte de toda a planta. Diz ainda o autor que obteve, consistentemente, excelentes resultados em inoculações com suspensão de esporos, quando outros métodos de inoculação falharam. Não fornece, porém, detalhes da quantidade e da concentração da suspensão de esporos utilizadas. GOTH e OSTAZESKI (1965) fazem referência a testes de patogenicidade de alguns isolados de *M. phaseolina*, através de inoculação com suspensão de esporos aplicados às hastes e folhas de feijão, conforme metodologia descrita por LUTTRELL (1946), sem especificarem, também, a quantidade e a concentração da suspensão utilizada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos sete experimentos, sendo quatro em laboratório e três em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz" da Universidade de São Paulo, em Piracicaba, SP, entre janeiro de 1975 e fevereiro de 1976.

Os isolados de *M. phaseolina* utilizados nos diversos experimentos, assim como sua procedência e data de obtenção encontram-se relacionados na Tabela 1.

Tabela 1. Número, hospedeiro, procedência e data de obtenção dos isolados de *M. phaseolina* estudados.

Nº Isolado	Hospedeiro	Procedência	Data Isolam.
Isolado nº. 01	Soja	Alegrete, RS	Novembro 1973
Isolado nº. 02	Soja	Bagé, RS	Novembro 1973
Isolado nº. 06	Feijão	Belém, PA	Outubro 1974
Isolado nº. 07	Feijão	Piracicaba, SP	Novembro 1974
Isolado nº. 08	Feijão	Piracicaba, SP	Dezembro 1974
Isolado nº. 10	Milho	Sete Lagoas, MG	Janeiro 1975
Isolado nº. 11	Sorgo	Sete Lagoas, MG	Janeiro 1975
Isolado nº. 12	Soja	Guaíba, RS	Janeiro 1975

Os isolados foram identificados confrontando-se com as descrições de ROGER (1953) e FIGUEIREDO *et alii* (1969).

4.1. Experimento 1. Influência de meios de cultura e superposição de papel de filtro na esporulação de *M. phaseolina*.

4.1.1. Isolado

Neste experimento foi utilizado o isolado número 7, constante da Tabela 1.

4.1.2. Meios de Cultura e Tratamentos

Foram testados os meios de cultura BDA, farinha de aveia-ágar e farinha de soja-ágar, com e sem superposição de papel de filtro esterilizado na superfície dos meios solidificados.

Os meios de BDA (extrato de batata, 200g; dextrose, 20g; ágar, 12 g; água destilada, q.s.p. 1.000ml) e de farinha de aveia-ágar (farinha de aveia, 60g; ágar, 12g; água destilada, q.s.p. 1.000ml) foram feitos segundo TUIE (1969) e o de farinha de soja-ágar (farinha de soja, 60 g; ágar, 12g; água destilada, q.s.p. 1.000ml) baseado na fórmula do meio de aveia-ágar. O pH inicial foi ajustado para 6,0, antes da autoclavagem, de acordo com AHMED e AHMED (1969). Estes meios, após esterilização em autoclave (1 atm de pressão por 15 minutos) foram vertidos em placas de

Petri de 9 cm de diâmetro. Após 24 horas, discos de papel de filtro esterilizados (autoclave 1 atm de pressão por 15 minutos + estufa seca a 180°C, por 2 horas), também com 9cm de diâmetro, foram superpostos à superfície do meio solidificado. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com 6 tratamentos e 6 repetições.

4.1.3. Método de plaqueamento e incubação

Para obtenção do inóculo inicial, o fungo foi cultivado em placas de Petri contendo BOA, por 48 horas. Após esse período foram cortados, dos bordos das colônias, discos de 4mm de diâmetro e transferidos para o centro das placas com os diferentes meios de cultura, cada um deles, com e sem superposição de papel de filtro. As placas foram então mantidas no interior de BIODTRONETE MARK III ENVIRONMENTAL CHAMBER, com luz contínua, fornecida por duas lâmpadas fluorescentes GE de 40 watts, luz do dia, 40 r ID, a uma distância de 35cm acima da superfície das placas, por um período de sete dias. A temperatura foi mantida a $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

4.1.4. Método de avaliação

A avaliação foi realizada, após sete dias de incubação, através da contagem do número de picnídios formados em 10 campos do microscópio estereoscópico WILD M5, com aumento de 37,5 vezes, por placa de Petri, em cada tratamento. Foram contados apenas os picnídios que apresentaram exudação de esporos, como se pode ver na Figura 1, que mostra picnídios do isolado 7, formados em placa de Petri, contendo meio de farinha

de soja-ágar, com superposição de papel de filtro, incubado por sete dias sob luz contínua, em temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

Fig. 1. Picnídios de *M. phaseolina* produzidos em meio de cultura artificial: A) picnídios com exudação de esporos; B) picnídios sem exudação de esporos. Fo to: câmara fotoautomática WILD MKa-5; microscópio estereoscópio WILD M8; filme Ektachrome 135x36 - 64 ASA; iluminação 2 lâmpadas Philips 6V - 15W , com filtro azul. Aumento de 8x.

Para facilitar a contagem, foram colocadas 10 gotas de álcool ao acaso, em cada placa, com o objetivo de facilitar a visualização dos picnídios, às vezes, escondidos pelo micélio (Fig.2).

Fig. 2. Aspecto de uma cultura de *M. phaseolina* em placa de Petri, onde foi colocado uma gota de álcool para facilitar a contagem dos picnídios. Foto: câmara fotoautomática WILD MKa-5, microscópio estereoscópico WILD M8; filme Ektachrome 135x36-64 ASA; iluminação 2 lâmpadas Philips 6V - 15W , com filtro azul. Aumento de 3,84x.

4.2. Experimento 2. Influência da luz na esporulação de *M. phaseolina*.

Com base nos resultados obtidos no experimento anterior foi utilizado neste experimento o meio de farinha de soja-água, com superposição de papel de filtro. A metodologia de obtenção de inóculo e plaqueamento foi semelhante à descrita para o experimento 1. O delineamento foi o de blocos casualizados com 6 tratamentos e 5 repetições.

4.2.1. Isolado

Para este estudo foram utilizados os isolados de número 7 e 1, mostrados na Tabela 1.

4.2.2. Incubação

A incubação foi feita em três diferentes regimes luminosos: luz contínua, luz alternada (12 horas de luz e 12 horas de escuro) e escuro contínuo. Todos os tratamentos foram incubados no interior de BIOTRONETE MARK III ENVIRONMENTAL CHAMBER e a fonte luminosa foi a mesma descrita no experimento 1. O regime de escuro foi conseguido envolvendo-se as placas, individualmente, em papel alumínio. A temperatura foi mantida a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

4.2.3. Avaliação

O método de avaliação foi o mesmo utilizado no estudo de

meios de cultura e superposição de papel de filtro.

4.3. Experimento 3. Comparação da capacidade de esporulação de cinco isolados de *M. phaseolina*.

4.3.1. Isolado

Neste ensaio foram utilizados os isolados 1, 2, 6, 7 e 8 constante da Tabela 1.

4.3.2. Meio de Cultura, Tratamentos, Plaqueamento e Incubação

O meio de cultura utilizado foi o de farinha de soja-ágar com superposição de papel de filtro. O plaqueamento e incubação foi semelhante ao descrito no experimento 1. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com 10 tratamentos e 4 repetições, sendo a avaliação idêntica à descrita para os experimentos anteriores.

4.4. Experimento. Efeito de repicagem sucessiva, em dois regimes de luz, na esporulação de *M. phaseolina*.

4.4.1. Isolado

Neste ensaio foi utilizado o isolado número 8, constante

da Tabela 1.

4.4.2. Meios de cultura e método de repicagens

Para este experimento o fungo foi inicialmente cultivado em seis tubos de ensaio, contendo meio BDA, mantidos em luz e temperatura ambiente. Após sete dias, discos de 4mm de diâmetro contendo meio de cultura e micélio do fungo foram transferidos de um dos tubos para o centro de placas de Petri contendo meio de farinha de soja-ágar, com superposição de papel de filtro. O mesmo meio de cultura foi então utilizado durante todo o experimento. A incubação das placas foi feita da mesma maneira descrita no experimento 1, em dois regimes de luz: luz contínua e escuro. O escuro foi conseguido envolvendo-se as placas individualmente em papel alumínio. Uma semana após, o fungo incubado em luz contínua foi transferido para outra placa nas mesmas condições. O fungo incubado no escuro, foi transferido para outra placa que, por sua vez, foi também envolvida em papel alumínio. Concomitantemente, de um segundo tubo dos seis originais o fungo foi transferido para o centro de placas contendo o meio já descrito. Desse modo foram incubadas, juntas, placas contendo o fungo em 1^a. repicagem em luz contínua, 1^a. repicagem no escuro, 2^a. repicagem em luz contínua e 2^a. repicagem no escuro. Assim foi feito sucessivamente por seis semanas. Ao final desse período, todos os tratamentos foram transferidos para novas placas e então incubadas em regime de luz contínua por mais sete dias. Assim ao final de seis semanas, foi comparada a capacidade de esporulação do isolado que sofreu de uma a seis repicagens nos regimes de luz contínua e no escuro (Figura 3). O método de ava

liação foi o mesmo descrito para os demais experimentos. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com 12 tratamentos e 3 repetições.

Fig.3. Representação gráfica do experimento sobre o efeito de seis repicagens sucessivas realizadas com intervalos de sete dias, em um isolado de *M. phaseolina* em dois regimes de luz, onde T = tubos de ensaio, OR = tubo original, R = repicagens, LC = luz contínua e ES = escuro.

4.5. Experimento 5. Efeito da concentração de inóculo de *M. phaseolina* na reação de quatro diferentes hospedeiros.

4.5.1. Isolado

O isolado utilizado neste experimento foi o de numero 12, descrito na Tabela 1.

4.5.2. Hospedeiros

Foram testados quatro diferentes hospedeiros: feijão - cultivar Carioca, soja - cultivar Planalto, sorgo - cultivar Desconhecido e Milho - cultivar Centralmex.

4.5.3. Obtenção e preparo do inóculo

O fungo foi cultivado em 10 placas de Petri, contendo meio de farinha de soja-ágar, com superposição de papel de filtro, em regime de luz contínua, de maneira semelhante a descrita no experimento 1. A suspensão de esporos inicial, foi conseguida após sete dias de incubação, adicionando-se, em cada placa, 10ml de água destilada esterilizada sobre a superfície das colônias esporuladas, raspando-se então essas superfícies suavemente com pincel macio. Estas suspensões foram filtradas através de gaze fina e recolhidas em um Erlenmeyer. A concentração do inóculo desse frasco foi determinada em Hemocitômetro e, por diluição, foram ajustadas as demais concentrações.

4.5.4. Concentração do inóculo e método de inoculação

Foram usadas quatro concentrações de inóculo, além da tes
temunha:

0 - água destilada estéril (testemunha)

1 - 1×10^3 esporos/ml

2 - 1×10^4 esporos/ml

3 - 1×10^5 esporos/ml

4 - 1×10^6 esporos/ml

As sementes dos quatro hospedeiros foram pré-germinadas por quatro dias, em bandejas de plástico, sobre papel toalha umedecido, em ambiente escuro. No quinto dia, as plântulas de cada um dos hospedeiros foram retiradas das bandejas, mergulhadas por 1 minuto em 15ml da sus pensão de esporos nas concentrações indicadas e plantadas em vaso de bar ro, com 20cm de boca, contendo 2kg de solo esterilizado por autoclavagem e colocados em casa de vegetação. Foram usadas 10 plantas por vaso em cada repetição de cada tratamento, perfazendo um total de 30 plantas de cada hospedeiro em cada concentração de inóculo.

O delineamento experimental foi o de parcelas inteiramente casualizadas com tratamentos em fatorial (5 concentrações de inóculo x 4 hospedeiros) e com 3 repetições.

A avaliação foi feita 15 dias após o plantio, pela conta gem do número de plantas que sobreviveram em cada vaso.

4.6. Experimento 6. Efeito de inoculação cruzada de *M. phaseolina* em duas cultivares de quatro diferentes hospedeiros.

4.6.1. Isolado

Neste experimento foram utilizados os isolados 7, 10, 11 e 12 constantes da Tabela 1.

4.6.2. Hospedeiros

Foram testadas duas cultivares de cada um dos seguintes hospedeiros:

1. Soja, cultivares Prata e Paraná
2. Milho, cultivares DG e M-102
3. Sorgo, cultivares IAC-SART e Desconhecido
4. Feijão, cultivares Carioca e Goiano

4.6.3. Obtenção, preparo e concentração do inóculo

O inóculo dos diversos isolados foi obtido e preparado de maneira semelhante ao descrito no experimento 5. Devido aos resultados obtidos no experimento anterior, foi utilizada a concentração de 1×10^6 esporos/ml.

4.6.5. Método de inoculação

As sementes de cada cultivar dos quatro diferentes hospedeiros foram mergulhadas em 15ml da suspensão de esporos, nas concentrações indicadas, durante 1 minuto e logo após plantadas em vasos de barro com 20cm de boca, contendo 2kg de solo esterilizado por autoclavagem, colocados em casa de vegetação. Foram plantadas 10 sementes de cada cultivar por vaso em cada repetição. O delineamento experimental foi o de parcelas inteiramente casualizadas com tratamentos em fatorial (5 isolados x 8 cultivares) e com 3 repetições.

A avaliação foi realizada 12 dias após o plantio, através da contagem de plantas vivas em cada vaso. Para as cultivares de sorgo e milho foi, também, avaliado o tamanho médio de plantas (cm) e o peso seco médio (g) em cada repetição.

4.7. Experimento 7. Reação de 10 cultivares de soja a *M. phaseolina*

4.7.1. Isolado

O isolado utilizado neste experimento foi o de número 7, anteriormente citado.

4.7.2. Cultivares

Foram testadas as seguintes cultivares de soja: Hampton, Prata, Cocker 338, Paraná, Davis, Cocker 102, Santa Rosa, Bossier, Viçosa e IAS-1.

4.7.3. Obtenção, preparo e concentração do inóculo e método de inoculação.

A metodologia empregada para a obtenção, preparo e concentração do inóculo, assim como o método de inoculação foram os mesmos descritos no experimento de efeito de inoculação cruzada. O delineamento experimental foi o de parcelas inteiramente casualizadas, com 20 tratamentos e 5 repetições.

4.7.4. Avaliação

A avaliação foi feita, 15 dias após o plantio, através da contagem do número de plantas que sobreviveram em cada repetição.

4.8. Análise estatística dos experimentos

Para a análise de variância dos resultados dos experimentos 1, 2, 3 e 4, procedeu-se a mudança de escala dos dados, usando-se a transformação logarítmica. Para os experimentos 5, 6 e 7 usou-se a trans

formação em arco-seno. Ambas as transformações foram realizadas com a finalidade de homogeneizar a variância dos tratamentos e normalizar a variância dos resíduos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Experimento 1. Influência de meios de cultura e superposição de papel de filtro na esporulação de *M. phaseolina*.

Os resultados apresentados na Tabela 2, mostram que o isolado testado esporulou nos três meios de cultura utilizados, comportando-se de maneira diferente em cada um deles, no que diz respeito à quantidade de picnídios formados.

A análise de variância, Tabela 3, comprova que existe diferença altamente significativa entre meios de cultura. O teste de Duncan a 5% aplicado às médias apresentadas na Tabela 2, evidencia que a esporulação de *M. phaseolina* foi significativamente superior no meio de farinha de soja, em relação aos meios de aveia e BDA, e que o meio de aveia, por sua vez, foi superior ao de BDA. Esta observação é original, pois não há na literatura nenhum trabalho que aborde a esporulação do fungo quantita-

tivamente em diferentes meios de cultura, mas apenas de maneira qualitativa.

Tabela 2. Efeito do meio de cultura e da superposição de papel de filtro na formação de picnídios de um isolado de *M. phaseolina*.

Meios de Cultura	Repet.	Número de picnídios ^{1/} nos meios		Média
		C/papel	S/papel	
Soja	1	1.979	166	
	2	1.405	820	
	3	1.072	817	
	4	1.513	750	
	5	1.406	890	
	6	1.548	563	
	Média	1.456,83	667,67	1.062,25 ^{2/} a
Aveia	1	50	10	
	2	65	38	
	3	44	39	
	4	89	8	
	5	81	54	
	6	64	16	
	Média	65,50	27,50	46,50 b
BDA	1	4	1	
	2	34	4	
	3	2	2	
	4	3	3	
	5	6	1	
	6	9	3	
	Média	9,67	2,33	5,92 c
Média		510,67 ^{2/} a	232,50 b	

^{1/} Total de contagem em 10 campos de 37,5 aumentos/placa

^{2/} Valores seguidos de uma mesma letra não diferem significativamente, segundo o teste de Duncan a 5%.

KNOX-DAVIES (1965) e mais tarde OOSTUIZEN e POTGIETER (1974) conseguiram induzir esporulação em diversos isolados do fungo cultivando-

os em meio de farinha de amendoim-ágar ou em extratos de farinha de amendoim e concluem que os ácidos graxos livres, existentes nesses substratos são os fatores responsáveis pela esporulação. É possível que o alto teor de óleo existente na farinha de soja, seja também, um dos fatores responsáveis pela alta esporulação obtida no meio de cultura preparado com farinha de soja-ágar.

Observa-se também, na Tabela 3, que a diferença entre presença e ausência de papel de filtro foi altamente significativa e que a interação meios de cultura x papel de filtro não foi significativa. A adição de papel de filtro na superfície dos meios solidificados, induziu um aumento na esporulação, como indicado na Tabela 2. Esse efeito foi semelhante nos três meios estudados. O efeito do papel de filtro sobre o aumento da esporulação já foi comprovado por REIS (1973), em estudos realizados com *Colletotrichum dematium* f. *truncata* (Schw) Von ARX. O autor comenta que, possivelmente, o aumento da superfície esporulante conferida pelo papel de filtro seja o responsável pela maior esporulação. Levanta-se aqui, a hipótese de que a utilização da celulose do papel de filtro pelo fungo seja, também, um dos fatores responsáveis pelo incremento na produção de picnídios.

De modo geral, os resultados deste experimento discordam com o que relata a maior parte da literatura sobre o assunto. Normalmente é citado que *M. phaseolina* é facilmente isolado de seus hospedeiros naturais e cultivado em meios artificiais ou meios naturais simples e de fácil preparo ou ainda em planta ou partes de planta. Entretanto produz

pouca ou nenhuma esporulação nesses meios de cultura e o faz em planta, ou parte dela, apenas quando se manipulam outros fatores ambientes, às vezes, muito complexos (LUTTRELL, 1946; ROGER, 1953; THIRUMALACHAR, 1953; ASHWORTH, 1959; KULKARNI *et alii*, 1962, GOTH e OSTAZESKI, 1965; AHMED e AHMED, 1969; SINGH e CHOCHAN, 1972).

Tabela 3. Análise de variância dos dados do experimento 1.

Fontes de Variação	GL	QM	F
Blocos	5	4,9853	1,93
Meios de cultura	2	1066,3182	412,76**
Papel filtro	1	79,5367	30,79**
Interação meios de cultura x papel de filtro	2	6,0402	2,34
Resíduo	25	2,5834	
Total	35		
C.V. %		17,6	

** Indica significância ao nível de 1% de probabilidade.

Durante a realização deste trabalho, observou-se que o período de sete dias é crítico para a contagem dos picnídios, pois a partir do oitavo dia, os esporos iniciam a germinação, mesmo quando agrupados sobre os picnídios, dificultando sua distinção dentro da colônia (Figura 4).

Fig.4. Esporos de *M. phaseolina* iniciando a germinação , ainda agrupados sobre os picnídios. Foto: câmara fotoautomática WILD MKa-5; microscópio estereoscó

ptico WILD M8; filme Ektachrome 135x36 - 64 ASA; i
luminação 2 lâmpadas Philips 6V - 15W, com filtro azul. Aumento de 8x.

5.2. Experimento 2. Influência da luz na esporulação de *M. phaseolina*

Os resultados deste experimento são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Efeito de três regimes luminosos na formação de picnídios em dois isolados de *M. phaseolina*.

Isolados	Repet.	Número de picnídios ^{1/} nos regimes luminosos		
		Luz contínua	Luz alternada	Escuro
Isolado 7	1	755	168	0
	2	832	98	0
	3	820	95	0
	4	1.137	67	0
	5	1.278	278	0
	Média	964,40 ^{2/} a	141,20 b	0,00
Isolado 1	1	92	0	0
	2	67	0	0
	3	127	0	0
	4	48	0	0
	5	53	0	0
	Média	77,40 b	0,00	0,00

^{1/} Total de contagens em 10 campos de 37,5 aumentos/placa

^{2/} Valores seguidos de uma mesma letra não diferem significativamente, segundo o teste de Duncan a 5%.

Analisando os dados apresentados na Tabela 4, observa-se, visualmente, uma diferença na capacidade de esporulação sob diferentes condições de luz, entre os dois isolados testados. O isolado 7 produziu picnídios tanto em luz contínua como em luz alternada, não esporulando apenas no escuro. Por outro lado o isolado 1 esporulou apenas sob luz contínua e não produziu nenhum picnídio em luz alternada ou no escuro. Estes

efeitos diferenciais qualitativos entre isolados já foram estudados por diversos autores, havendo, entretanto, divergência de opiniões no que se refere ao melhor regime luminoso para esporulação. Alguns trabalhos relatam que luz contínua foi melhor (GOTH e OSTAZESKI, 1965; KNOW-DAVIES, 1965; RAO *et alii*, 1973; MACHADO e KIMATI, 1975), porém outros concluem que luz alternada induziu maior esporulação (ASHWORTH, 1959; OOSTUIZEN e POTGIETER, 1974; CHIDAMBARAM e MATHUR, 1975). Entretanto, com apenas uma exceção, esses autores concordam que não há esporulação em regime de escuro, o que é confirmado neste experimento. A exceção é feita a GOTH e OSTAZESKI (1965) que encontraram isolados que também esporulavam erráticamente no escuro, porém não quantificam essa esporulação.

Considerando apenas os números de picnídios produzidos pelo isolado 7 em luz contínua e luz alternada e pelo isolado 1 em luz contínua, a análise de variância mostra que houve diferença altamente significativa entre os tratamentos (Tabela 5).

Tabela 5. Análise de variância do experimento 2.

Fontes de Variação	GL	QM	F
Tratamentos	2	1,7295	52,23**
Resíduo	12	0,0331	
Total	14		
C.V. %		7,88	

** Indica significância ao nível de 1% de probabilidade.

Essas diferenças podem ser constatadas nas médias apresentadas na Tabela

4, que permitem concluir que o isolado 7 em luz contínua foi muito superior aos demais tratamentos, que por sua vez não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Isso mostra que os diferentes isolados reagiram diferentemente quando submetidos a regimes luminosos diversos e que o isolado 7 esporulou mesmo em luz alternada, embora o regime de luz contínua tenha sido o melhor. Por outro lado, a ausência de esporulação do isolado 1 em luz alternada indica, possivelmente, uma menor capacidade de esporulação desse isolado ou então, a necessidade de um outro fator desencadeado pela luz contínua e que não se fez necessário ao isolado 7.

5.3. Experimento 3. Comparação da capacidade de esporulação de cinco isolados de *M. phaseolina*.

Os dados deste experimento, apresentados na tabela 6, mostram que, embora os cinco isolados estudados tenham esporulado, houve uma grande variação na capacidade de esporulação entre eles, assim como um aumento no número de corpos frutíferos férteis de um mesmo isolado, em presença de papel de filtro.

Tabela 6. Variabilidade na capacidade de formação de picnídios de cinco isolados de *M. phaseolina* cultivados em meio de farinha de soja -ágar com e sem superposição de papel de filtro.

Isolados	Repet.	Número de picnídios ^{1/} no meio de soja		Médias Isolados
		C/papel	S/papel	
Isolado 7	1	1.528	1.356	1.557,38 ^{a 2/}
	2	1.943	1.259	
	3	1.896	1.352	
	4	1.908	1.217	
	Média	1.818,75	1.296,00	
Isolado 2	1	838	856	892,38 b
	2	1.114	918	
	3	1.133	932	
	4	774	574	
	Média	964,75	820,00	
Isolado 8	1	1.081	588	847,13 b
	2	1.185	902	
	3	1.052	669	
	4	786	514	
	Média	1.026,00	668,25	
Isolado 6	1	726	308	572,75 c
	2	689	179	
	3	1.192	581	
	4	706	201	
	Média	828,25	317,25	
Isolado 1	1	159	67	119,13 d
	2	132	127	
	3	292	83	
	4	34	59	
	Média	154,25	84,00	
Médias		958,40 ^{a 2/}	638,10 b	

^{1/} Total de contagem em 10 campos de 37,5 aumentos/placa

^{2/} Valores seguidos de uma mesma letra não diferem significativamente, segundo o teste de Duncan a 5%.

A análise de variância, Tabela 7, indica que houve diferen

gas altamente significativas entre isolados e entre presença e ausência de papel de filtro e não significância da interação de isolados x papel de filtro.

Tabela 7. Análise de variância do experimento 3.

Fontes de Variação	GL	QM	F
Blocos	3	0,1032	5,26
Isolados	4	1,6613	84,62**
Papel de Filtro	1	0,4306	21,93**
Interação isolados x papel de filtro	4	0,0421	2,14
Resíduo	27	0,0196	
Total	39		
C.V. %		5,11	

** Indica significância ao nível de 1% de probabilidade.

Comparando as médias dos isolados, Tabela 6, pelo teste de Duncan a 5%, constata-se que o isolado 7 foi superior a todos os demais, enquanto que o isolado 8 não diferiu estatisticamente do isolado 2, quanto à produção de picnídios, mas ambos foram superiores aos isolados 6 e 1. O isolado 6, entretanto, esporulou bem mais que o isolado 1. A variação na capacidade de esporulação já foi relatada em alguns trabalhos. LUTTRELL (1946) estudando diferentes isolados, encontrou variação na capacidade de esporulação, pois dos muitos isolados testados apenas um produziu picnídios em BDA. ASHWORTH (1959), em 35 isolados, encontrou variação na capacidade de esporulação variando o substrato para o cultivo do fungo.

A diferença altamente significativa entre presença e ausência de papel de filtro, comprovada pelas médias mostradas na Tabela 6, ratificam os resultados obtidos no experimento 1, pois em todos os isolados testados, a adição de papel de filtro proporcionou um aumento do número de picnídios férteis. A interação não significativa entre isolados x papel de filtro, por sua vez, indica que este aumento no número de picnídios férteis, obtido pela adição de papel de filtro, ocorreu com todos os isolados estudados.

5.4. Experimento 4. Efeito de repicagem sucessiva, em dois regimes de luz na esporulação de *M. phaseolina*.

Na Tabela 8 são apresentados os dados obtidos neste experimento. As médias apresentadas nesta Tabela, mostram os efeitos de repicagem dentro de luz contínua e escuro. Verifica-se que o teste de Duncan a 5% não indica diferença significativa do efeito de repicagens em ausência de luz. Entretanto em presença de luz contínua, observa-se a tendência a um decréscimo na esporulação a medida que se procederam às repicagens, sendo que da quinta para a sexta repicagem houve uma queda brusca do número de picnídios produzidos. É possível que se as repicagens fossem efetuadas por maior número de vezes, o decréscimo na esporulação atingisse o ponto em que culturas não esporulantes fossem conseguidas.

Tabela 8. Efeito de repicagens sucessivas sob dois regimes de luz na formação de picnídios de um isolado de *M. phaseolina*.

Repicagens	Repet.	Número de picnídios ^{1/} nas repicagens em	
		Luz contínua	Escuro
R ₁	1	1.361	1.012
	2	1.354	1.418
	3	1.354	1.268
	Média	1.356,33 a ^{2/}	1.232,67 a ^{2/}
R ₂	1	1.146	1.267
	2	1.356	1.320
	3	1.248	1.291
	Média	1.250,00 a	1.292,67 a
R ₃	1	1.158	1.290
	2	1.292	1.268
	3	1.284	1.107
	Média	1.244,67 a	1.221,67 a
R ₄	1	947	1.140
	2	1.106	1.174
	3	1.173	1.053
	Média	1.075,33 b	1.122,33 a
R ₅	1	925	1.246
	2	1.046	1.201
	3	1.092	1.215
	Média	1.021,00 b	1.220,67 a
R ₆	1	202	1.157
	2	319	1.287
	3	259	1.223
	Média	260,00 c	1.222,53 a

^{1/} Total de contagens em 10 campos de 37,5 aumentos/placa. Picnídios produzidos em meio de soja sob luz contínua.

^{2/} Valores seguidos de uma mesma letra não diferem significativamente, segundo o teste de Duncan a 5%.

ASHWORTH (1959) e GOTH e OSTAZESKI (1965), obtiveram resul

tados semelhantes quando realizaram sucessivas repicagens em massa por várias gerações e constataram que a esporulação decrescia até que tipos não esporulantes predominassem. Entretanto não fazem referência sobre o regime de luz em que essas repicagens foram feitas.

A Tabela 9, mostra a análise de variância dos dados. Nessa análise pode-se observar que os efeitos de repicagem e luz foram altamente significativas. A interação dos efeitos de repicagem x efeitos de luz foi, também, altamente significativa, indicando que as repicagens tiveram comportamento diferenciado frente aos regimes de luz contínua e escuro.

Tabela 9. Análise de variância do experimento 4.

Fontes de Variação	GL	QM	F
Blocos	2	0,0110	9,17
Repicagens	5	0,1146	95,50**
Efeito da luz	1	0,1365	113,75**
Repicagens x efeito da luz	5	0,1138	94,83**
Resíduo	22	0,0012	
Total	35		
C.V. %		1,15	

** Indica significância ao nível de 1% de probabilidade.

Os resultados obtidos neste experimento permitem indicar que quando houver necessidade de repicar culturas de *M. phaseolina*, estas repicagens sejam feitas sucessivamente no escuro, pois sua capacidade de esporulação não é afetada nessas condições.

5.5. Experimento 5. Efeito da concentração de inóculo de *M. phaseolina* na reação de quatro diferentes hospedeiros.

Os resultados obtidos neste experimento são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Reação de quatro hospedeiros frente à inoculação de sementes pré-germinadas com diferentes concentrações de esporos de *M. phaseolina*.

Concentração do inóculo	Sobrevivência ^{1/} dos hospedeiros				Médias	
	Feijão	Soja	Sorgo	Milho		
0	9,67	9,00	8,00	9,33	9,00	a ^{2/}
1 x 10 ³ esp/ml	8,33	9,33	7,00	8,33	8,25	b
1 x 10 ⁴ esp/ml	7,67	8,00	6,33	6,67	7,17	c
1 x 10 ⁵ esp/ml	8,00	5,00	6,00	6,00	6,25	d
1 x 10 ⁶ esp/ml	6,00	4,33	4,67	1,00	4,00	e

^{1/} Médias de plantas sobreviventes em três repetições, cada uma representada por 1 vaso contendo 10 plantas.

^{2/} Valores seguidos de uma mesma letra não diferem significativamente, segundo o teste de Duncan a 5%.

Uma análise visual desses dados mostra reações semelhantes dos quatro hospedeiros testados frente às diversas concentrações do inóculo.

A análise de variância, Tabela 12, comprova que não houve diferença significativa de suscetibilidade entre os hospedeiros. Entretanto houve diferença altamente significativa entre as diversas concentrações.

ções de inóculo empregadas.

Tabela 11. Análise de variância do experimento 5.

Fontes de Variação	GL	QM	F
Hospedeiros	3	26,6332	2,66
Concentração inóculo	4	178,4995	17,82**
Interação hospedeiro x concentração inóculo	12	13,8718	1,38
Resíduo	40	10,0174	
Total	59		
C.V. %		23,78	

** Indicam significância ao nível de 1% de probabilidade.

As médias apresentadas na Tabela 10 mostram que na medida em que se aumentou a concentração do inóculo, houve um decréscimo no número de plantas que sobreviveram em todos os hospedeiros testados.

A calibração da concentração do inóculo é de suma importância na seleção de cultivares resistentes pois essa concentração funciona como fator de pressão de seleção, sendo possível escolher o nível de resistência da seleção (WALKER, 1965).

A concentração de esporos utilizada na inoculação deverá ser tal que proporcione uma diferença em relação à testemunha que seja de se^uável e estatisticamente detectável. Por outro lado não deverá ser excessivamente alta de maneira que elimine a totalidade das plantas inocu-

ladas.

Dentre as concentrações da suspensão de esporos de *M. phaseolina* utilizada neste experimento a de 1×10^6 esporos/ml, parece ter sido a mais adequada, pois o número de plantas que sobreviveram em relação à testemunha nos quatro hospedeiros testados foi estatisticamente significativa. Esta concentração poderá ser utilizada na seleção de cultivares resistentes e/ou tolerantes ao patógeno, em qualquer um dos hospedeiros testados.

5.6. Experimento 6. Efeito de inoculação cruzada de *M. phaseolina* em duas cultivares de quatro diferentes hospedeiros.

Os resultados obtidos neste experimento são apresentados na Tabela 12. Analisando esses dados verifica-se que as duas cultivares de feijão são altamente suscetíveis aos quatro isolados testados, pois quando comparadas visualmente às suas respectivas testemunhas, percebe-se que as diferenças são marcadamente grandes. Julgou-se, portanto, não ser necessário incluir esse hospedeiro na análise de variância. Para os demais hospedeiros, essa análise foi efetuada, sendo apresentada na Tabela 13.

A análise de variância mostra que houve diferenças significativas entre hospedeiros, entre cultivares dentro de hospedeiros, entre inóculos e também para a interação inóculo x hospedeiros. Entretanto a

Tabela 12. Patogenicidade de quatro isolados de *M. phaseolina* inoculados em sementes de duas cultivares de quatro diferentes hospedeiros.

Tratamentos.	Sobrevivência ^{1/} das cultivares nos hospedeiros										
	S O J A		M I L H O		S O R G O		F E I J A ^{2/}				
	'Prata'	'Paraná'	Média Cultivares	'OG'	'M-102'	Média Cultivares	'Desc'	'IAC-SART'	Média Cultivares	'Carloca'	'Golano'
Testemunha	8,67	8,33	8,50 ^{3/}	9,00	9,00	9,00 ^{3/}	9,67	7,33	8,50 a	30	29
Isolado 11	9,00	6,33	7,67 a	9,33	9,67	9,50 a	9,67	6,33	8,00 a	0	2
Isolado 10	4,67	1,00	2,84 b	8,67	7,33	8,00 b	9,00	7,00	8,00 a	1	2
Isolado 12	0,67	0,00	0,34 c	8,67	10,00	9,34 ab	8,67	8,00	8,34 a	0	1
Isolado 7	0,00	0,00	0,00 c	8,67	7,67	8,17 b	9,33	6,00	7,67 a	0	0
Média ^{1/} Hospedeiros	3,87 a			8,80 b					8,10 b		

^{1/} Média de plantas sobreviventes em três repetições, cada uma representada por 1 vaso com 10 plantas.

^{2/} A magnitude das diferenças em relação a testemunha, dispõem análise estatística.

^{3/} Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente, segundo o teste de Duncan a 5%.

interação cultivares x inóculo dentro de hospedeiros não foi significativa.

A interação inóculo x hospedeiros foi caracterizada pelo efeito altamente significativo dos inóculos em soja, efeitos mais suaves em milho e ausência de efeito em sorgo, conforme pode ser observado pelas médias apresentadas na Tabela 12.

Devido aos efeitos pouco expressivos do inóculo sobre o número de plantas inoculadas sobreviventes em milho e sorgo, decidiu-se ampliar este experimento, comparando o efeito da inoculação sobre a altura e peso seco da parte aérea das plantas das duas cultivares de milho e das duas cultivares de sorgo (Tabela 14).

Tabela 13. Análise de variância do experimento 6.

Fontes de Variação	GL	QM	F
Hospedeiros	2	11244,6897	77,48**
Cultivares/hospedeiros	3	1514,1481	10,43**
Inóculo	4	2261,9682	15,58**
Inóculo x hospedeiros	8	1322,4333	9,11**
Cultivares x inóculo/ hospedeiros	12	191,4634	1,32
Resíduo	60	145,1382	
Total	89		
C.V. %		24,58	

** Indica significância ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 14. Altura de planta (cm), peso seco (g) e respectivas médias, de duas cultivares de milho e duas cultivares de sorgo, após inoculação com quatro isolados de *M. phaseolina*.

Tratamentos	Altura média de plantas (cm)				Peso Saco médio de plantas (g)							
	MILHO 'DG'	MILHO 'M-102'	MÉDIA ^{1/}	SORGO 'DESC.'	SORGO 'IAC-SART'	MÉDIA ^{1/}	MILHO 'DG'	MILHO 'M-102'	SORGO 'DESC.'	SORGO 'IAC-SART'	MÉDIA ^{1/}	
Testemunha	13,92 ^{2/}	14,92	14,42 a	14,36 ^{2/}	14,12	14,24 a	0,087 ^{2/}	0,110	0,0985 a	0,047 ^{2/}	0,039	0,0430 a
Isolado 12	13,38	13,81	13,60 ab	13,34	11,86	12,60 b	0,081	0,094	0,0875 b	0,041	0,031	0,0360 ab
Isolado 11	12,77	14,13	13,45 ab	12,40	11,83	12,12 bc	0,073	0,102	0,0875 b	0,038	0,030	0,0340 b
Isolado 7	12,18	12,88	12,53 b	10,61	9,22	9,92 d	0,065	0,092	0,0785 b	0,028	0,018	0,0230 c
Isolado 10	11,14	14,18	12,66 b	10,89	10,67	10,83 cd	0,063	0,095	0,0790 b	0,025	0,017	0,0210 c

^{1/} Valores seguidos por uma mesma letra não diferem significativamente, segundo o teste de Duncan a 5%.

^{2/} Médias de três repetições.

A análise de variância desses dados, apresentada na Tabela 15, mostra que, para milho, houve diferença significativa entre cultivares e entre isolados tanto para altura como para peso seco de plantas. Entretanto para sorgo, houve diferença entre cultivares apenas para peso seco. Por outro lado, os efeitos de isolados nesse hospedeiro foram signi-ficativos tanto para altura como para peso seco (Tabela 14).

Uma análise da Tabela 12 mostra que os quatro isolados tes-tados, independentemente do hospedeiro de onde foram obtidos, tiveram ação semelhante nas duas cultivares de cada uma das espécies, não havendo indicações de especificidade de um dado isolado a uma determinada cultivar dentro de hospedeiro. Entretanto, houve diferenças marcantes entre hospe-deiros. Feijão foi altamente suscetível a todos os isolados. Soja, exce-tuando-se o isolado 11, foi também altamente suscetível aos demais. Entre-tanto, milho e sorgo, pouco reagiram aos mesmos considerando-se o número de plantas sobreviventes. Porém, o tamanho médio e o peso seco médio de plantas das duas espécies sofreram redução quando inoculados com qualquer um dos isolados.

A literatura cita que é possível detectar raças fisiolôgi-cas de *M. phaseolina* baseando-se em características morfológicas da cultu-ra, patogenicidade, crescimento em diferentes meios de cultura, pH, carac-teres microscópicos ou especificidade a determinados hospedeiros (THIRUMA-LACHAR, 1953; SULAIMAN e PATIL, 1966; AHMED e AHMED, 1969; SINGH e CHOCHAN, 1972). Estudos preliminares realizados com os isolados testados neste ex-perimento mostraram que todos eles tinham o mesmo aspecto morfológico e

Tabela 15. Análise de variância para altura (cm) e peso sego (g) de plantas de duas cultivares de milho e duas cultivares de sorgo.

Fontes de Variação	GL	M i l h o		GL	S o r g o	
		Altura (cm)	Peso Seco (g)		Altura (cm)	Peso Seco (g)
		Q.M.			Q.M.	
Cultivares	1	115,2500**	0,041418**	1	43,2000	0,005468**
Isolados	4	31,9725**	0,003508**	4	147,4800**	0,004593**
Interação Cultivares x Isolados	4	14,2064	0,000721	4	6,9450	0,000021
Resíduo	20	6,6336	0,000579	20	14,0343	0,000349
Total	29			29		
C.V. %		6,44	9,31		10,46	19,75

** Indica significância ao nível de 1% de probabilidade.

fisiológico em cultura, crescendo e esporulando de maneira semelhante nos meios de cultura e nas condições ambientes usadas. Sendo assim, os resultados obtidos neste experimento, não permitem caracterizar raças fisiológicas diferentes entre os isolados testados, quando se consideram as interações de isolados com as cultivares de cada hospedeiro. Entretanto, considerando a interação de isolados com hospedeiros, inclusive feijão, pode-se sugerir a ocorrência de certa especialização pois, por exemplo, o isolado 11 é praticamente apatogênico para soja, milho e sorgo, mas altamente patogênico para feijoeiro.

Observou-se, também, discrepâncias no número de plantas inoculadas sobreviventes nas espécies estudadas neste experimento (Tabela 12) com o obtido no experimento 5 (Tabela 10). Naquele experimento, o número de plantas de milho e sorgo, quando inoculadas com o isolado 12, proveniente de soja, com a suspensão calibrada em 1×10^6 esporos/ml, apresentaram diferenças em relação a testemunhas muito maiores que as obtidas neste experimento, com o mesmo isolado, em idêntica concentração. Em feijão e soja o resultado foi oposto, sendo neste experimento maior a diferença em relação às testemunhas. Essas diferenças devem-se, provavelmente, aos distintos métodos de inoculação empregados nos dois experimentos, ou seja, sementes pré-germinadas no experimento 5 e sementes sem pré-germinação no experimento 6. A absorção de água pelas sementes de feijão e soja é muito maior que pelas sementes de milho e sorgo em um determinado período de tempo, pela própria característica do tegumento. Sendo assim, há em feijão e soja, maior adsorção de esporos às sementes quando imersas em uma suspensão, conferindo, nesse caso, um potencial de inóculo maior

nessas espécies do que em milho e sorgo.

À luz dessa informação, sugere-se que para trabalhos com milho e sorgo seja dada preferência ao método de inoculação em plântulas e que quando o objeto da pesquisa for soja e/ou feijão, sejam inoculadas as sementes.

5.7. Experimento 7. Reação de 10 cultivares de soja a *M. phaseolina*

Os dados obtidos neste experimento são mostrados na Tabela 16.

Pode-se notar, na Tabela 16, que houve uma grande variação no número de plantas que germinaram entre as testemunhas das 10 cultivares testadas, pois entre elas apenas a cultivar Santa Rosa apresentou germinação de 100% das sementes plantadas, sendo que a cultivar Cocker 338 apresentou germinação de apenas 72%. Estas diferenças provavelmente ocorreram devido à variação do poder germinativo das sementes, por ocasião da instalação do experimento.

Tabela 16. Capacidade de sobrevivência de cultivares de soja inoculadas com suspensão de esporos de *M. phaseolina* em sementes.

Cultivares	Sobrevivência ^{1/} em plantas		% Sobrevivência ^{2/}
	Testemunhas	Inoculados	
Viçoja	45	19	42,22 ^{3/} a
Santa Rosa	50	13	26,00 b
Bossier	43	9	20,93 c
Davis	40	5	12,50 d
Cocker 102	37	4	10,81 de
Hampton	46	4	8,70 e
IAS-1	41	3	7,32 e
Paraná	40	2	5,00 f
Prata	41	2	4,88 f
Cocker 338	36	1	2,78 f

1/ Total de cinco repetições, cada uma delas representada por 1 vaso com 10 plantas.

2/ Percentagem de sobreviventes ajustadas pela percentagem de germinação da testemunha.

3/ Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente, segundo o teste de Duncan a 5%.

Na análise de variância, Tabela 17, procurou-se eliminar as distorsões que as diferenças na germinação das testemunhas poderiam causar. Dessa maneira, trabalhou-se com percentagens de plantas inoculadas sobreviventes em relação às suas respectivas testemunhas.

Tabela 17. Análise de variância do experimento 7.

Fontes de Variação	GL	QM	F
Cultivares	9	225,9661	3,76**
Resíduo	40	60,0999	
Total	49		
C.V. %	85,85		

** Indica significância ao nível de 1% de probabilidade.

A análise de variância indica diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade entre cultivares e o teste de Duncan a 5% aplicado às médias apresentadas na Tabela 16, mostra que a cultivar Viçosa foi a que apresentou maior percentagem de plantas inoculadas sobreviventes seguida pela cultivar Santa Rosa. A cultivar Cocker 102 apresentou uma percentagem intermediária e a Cocker 338, foi a que teve a menor percentagem de germinação.

Nas condições em que foi realizado o experimento, os resultados obtidos permitem dizer que todas as 10 cultivares testadas foram suscetíveis a *M. phaseolina*. Entretanto o grau de suscetibilidade variou de maneira ampla indicando que o método de inoculação com suspensão de esporos do fungo é viável para testes de resistência varietal. Talvez novos testes com maior número de cultivares e concentrações de inóculo devam ser feitos, para detectar cultivares com alta resistência ou mesmo imunidade ao fungo.

O coeficiente de variação de 85,85%, considerado alto, o correu, possivelmente, devido a uma amostragem pequena. Nota-se, no entanto, que ainda foi possível detectar diferenças significativas de reação entre as diferentes cultivares. Recomenda-se que em experimentos semelhantes seja utilizado maior número de plantas por parcela experimental.

Os resultados obtidos neste experimento coincidem com a aqueles obtidos por LUTTRELL (1946) e GOTH e OSTAZESKI (1965) no que diz respeito à viabilidade do método de inoculação com suspensão de esporos. Entretanto acrescenta duas informações importantes. A primeira é a possibilidade de inocular diretamente as sementes de soja, o que simplifica muito o trabalho de inoculação e torna possível determinar com maior precisão a quantidade do inóculo aplicado. A segunda é a determinação da concentração do inóculo a ser aplicado, dado que não é especificado em nenhum desses dois trabalhos que tratam do assunto.

6. CONCLUSÕES

Do presente trabalho podem ser tiradas as seguintes conclusões:

. Para obtenção de abundante esporulação de *M. phaseolina* é importante considerar fatores ambientes como meio de cultura (meio de farinha de soja-ágar), superposição de papel de filtro na superfície do meio solidificado e regime de luz (luz contínua melhor do que luz alternada ou escuro).

. Repicagens sucessivas de *M. phaseolina* em presença de luz contínua causam decréscimo na capacidade de esporulação enquanto que repicagens sucessivas no escuro não alteram essa capacidade.

. A influência da concentração de inóculo na manifestação de sintomas da doença em feijão, soja, sorgo e milho, quando se inoculam sementes pré-germinadas, se faz sentir desde concentrações tão baixas como

mo 1×10^3 esporos/ml e mesmo a uma concentração de 1×10^6 esporos/ml ain da ocorrem plantas sobreviventes.

. Feijão e soja podem responder diferentemente a determinados isolados de *M. phaseolina* em inoculações em sementes pré-germinadas , o que demonstra uma certa especificidade do fungo.

. Para inoculações com suspensão de esporos de *M. phaseoli*na em sorgo e milho é conveniente trabalhar com plântulas, enquanto que, para feijão e soja a inoculação das sementes é mais adequada.

. A inoculação das sementes de milho e sorgo não afeta a sobrevivência, porém pode causar redução no tamanho e peso seco das plantas.

. Dentre as 10 cultivares de soja testadas, Viçoja apresenta menor suscetibilidade. A cultivar Cocker 102 apresenta reação intermediária e a Cocker 338 é a mais suscetível.

. É viável a utilização do método de inoculação de esporos de *M. phaseolina*, para detectar diferenças na reação entre cultivares de soja, podendo ser recomendado para seleção de resistência varietal nessa espécie.

7. SUMMARY

The influence of environmental factors on the sporulation, inoculum potencial, cross inoculation and reaction of 10 soybean cultivars to inoculation with spore suspension of *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. were studied in this paper. Three culture media were tested: soybean meal-agar, oat meal-agar and potato dextrose-agar (PDA) all of them with and without filter paper on the surface of solidified media. Among them the soybean meal-agar medium induced highest production of viable picnidia. The addition of filter paper increased sporulation in all media tested. Two isolates were incubated under constant light, alternated light (12 hours of light x 12 hours of darkness) and total darkness. Constant light induced abundant sporulation in both isolates. Under alternate light, there was picnidia formation in only one isolate and darkness inhibited sporulation in the two isolates tested. It was determined that successive mass transfers performed during six weeks, with seven days intervals, under constant light decreased sporulation capacity but this effect was not detected when transfers were carried out in the

dark. The results of the inoculum potential experiment indicated that concentrations as low as 1×10^3 spores/ml, when inoculated on seedlings, induced symptoms on soybean (*Glycine max* (L.) Merr.), bean (*Phaseolus vulgaris* L.), sorghum (*Sorghum* spp) and corn (*Zea mays* L.) plants but even at concentrations of 1×10^6 spores/ml surviving plants still occurred. Bean and soybean reacted differently to a given isolate when cross inoculations were performed on seedlings, indicating specificity of the fungus. Seed inoculations on corn and sorghum did not affect significantly the emergence but did affect the size and dry weight of plants. It is suggested that for corn and sorghum the inoculations should be made on seedlings and for bean and soybean, seeds should be inoculated. Among the 10 soybean cultivars tested, Viçoja had the lowest susceptibility, followed by Santa Rosa. The cultivar Cocker 102 had intermediate reaction and Cocker 338 was the most susceptible. It was also determined that the spore suspension method is a viable means of detecting differences in the reaction of soybean cultivars, its use being possible in screening soybeans for resistance to the fungus.

8. LITERATURA CITADA

- AHMED, N. e Q.A. AHMED, 1969. Physiological specialization in *M. phaseolina* (Maubl.) Ashby, causing stem rot of jute, *Corchorus* species. Mycopathologia et Mycologia Applicata 39(2):129-138.
- ASHBY, S.F., 1972. *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) Comb. Nov. The picnidial stage of *Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butl. Transactions of the British Mycological Society, 12:141-147.
- ASHWORTH Jr. L.J., 1959. Environmental and inherent factors that influence sporulation of *Macrophomina phaseoli*. Phytopathology, 49:533 (Abstract).
- BITANCOURT, A. A., 1935. Uma nova doença do feijão. O Biológico, 1:41.
- CHIDAMBARAM, P. e S.B. MATHUR, 1975. Production of picnidia by *Macrophomina phaseolina*. Transactions of the British Mycological Society, 64:(1) 165-168. (In: Review of Plant Pathology, 1975, 54:502).

- DADE, H.A. e J.G. GUNNELL, 1969. Class work with fungi. Kew, Surrey, England. Commonwealth Mycological Institute, 64 pp.
- DHINGRA, O.D. e J.B. SINCLAIR, 1972. Variation among isolates of *Macrophomina phaseoli* (*Rhizoctonia bataticola*) from different regions. Phytopathologische Zeitschrift, 76:200-204.
- DHINGRA, O.D. e J.B. SINCLAIR, 1972b. Variation among isolates of *Macrophomina phaseoli* (*Rhizoctonia bataticola*) from the same soybean plant. Phytopathology, 62:1108 (Abstract).
- DHINGRA, O.D. e J.B. SINCLAIR, 1973. Location of *Macrophomina phaseoli* on soybean plants related to culture characteristics and virulence. Phytopathology, 63:934-936.
- EDMUNDOS, L.K., 1964. Combined relation of plant maturity, temperature, and soil moisture to charcoal stalk rot development in grain sorghum. Phytopathology, 54:514-517.
- FERREIRA, L.P., P.S. LEHMAN e A.M.R. ALMEIDA, 1979. Doenças da Soja no Brasil. Londrina, PR, Embrapa - CNPSo. 42p. (Circular Técnica, 1).
- FIGUEIREDO, M.B.; J. TERANISHI E R.M.G. CARDOSO, 1969. Incidência de *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) Ash., (*Rhizoctonia bataticola* Taub.) em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e outras plantas cultivadas. O Biológico, 35:105-109.

- GARRET, S.D., 1956. Biology of root infecting fungi. London, Cambridge University Press, 293 pp.
- GHAFFAR, A. e G.A. ZENTMYER, 1968. *Macrophomina phaseoli* on some new weed hosts in California. Plant Disease Reporter, 52:223.
- GOTH, R. W. e S.A. OSTAZESKI, 1965. Sporulation of *Macrophomina phaseoli* on propylene oxide-sterilized leaf tissues. Phytopathology, 55:1156.
- HOFFMASTER, D.E.; J.H. McLAUGHLIN; W.W. RAY e K.S. CHESTER, 1943. The problem of dry rot caused by *Macrophomina phaseoli* (= *sclerotium bataticola*). Phytopathology, 33:1113-1114 (Abstract).
- ISSA, E.; J.N.M. REGIS; M.L. VIEIRA; J.T. ARAÚJO e S. MIYASAKA, 1964. Primeiros estudos para produção de sementes sadias de feijão em regiões áridas do Nordeste brasileiro. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, 31:21-25.
- JOOSTE, W.J., 1969. Infection of crops by *Rhizoctonia bataticola* as influenced by soil moisture. Phytophylactica, 1:15-18.
- KHARE, N.M.; N.K. JAIN e H.C. SHARMA, 1970. Variation among *Rhizoctonia bataticola* isolates from urid bean plant parts and soil. Phytopathology, 60:1290 (Abstract).

- KNOW-DAVIES, P.S., 1965. Pycnidium production by *Macrophomina phaseoli*. South African Journal of Agricultural Science, 8(1):205-218. (In: Review of Applied Mycology, 1965, 44:599).
- KULKARNI, N.B.; B.C. PATIL e M. SULAIMAN, 1962. Pycnidial formation by *Macrophomina phaseoli* on artificially inoculated cotton. Phytopathology, 52:369-371.
- LEHMAN, P.S.; C.C. MACHADO e M.T. TARRAGÓ, 1976. Frequência e severidade de doenças de soja nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Fitopatologia Brasileira, 1(3):183-193.
- LUTTRELL, E.S., 1946. A pycnidial strain of *Macrophomina phaseoli*. Phytopathology, 36:978-980.
- MACHADO, C.C. e H. KIMATI, 1975. Efeito de luz na formação de picnídios de *Macrophomina phaseolina* em meio de cultura. Summa Phytopathologica, 1:65-66.
- MATHUR, S.B. e W.E. SACKSTON, 1963. Effect of temperature and age of host on infection of sunflowers by *Sclerotium bataticola*. Phytopathology, 53:350 (Abstract).
- MAUBLANC, A., 1905. *Macrophoma phaseoli*. Bulletin de la Société Mycologic, France, 21:90.

- McCain, A.H. e R.S. SMITH Jr., 1972. Quantitative assay of *Macrophomina phaseoli* from soil. Phytopathology, 62:1098.
- MENDES, H.C.; I.J. RIBEIRO; E.CIA e J.ABRAHÃO, 1971. Estiolamento do algodoeiro causado por *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) Ashby. Bragantia, 30:T.1:XLIII-XLVIII.
- MEYER, W.A.; J.B. SINCLAIR e M.N. KHARE, 1973. Biology of *Macrophomina phaseoli* in soil studied with selective media. Phytopathology, 63 : 613-620.
- MEYER, W.A.; J.B. SINCLAIR e M.N. KHARE, 1974. Factors affecting charcoal rot of soybean seedlings. Phytopathology, 64:845-849.
- NORTON, D.C., 1953. Linear growth of *Sclerotium bataticola* through soil. Phytopathology, 43:633-636.
- OOSTHUIZEN, N.M.J.; D.J.J. POTGIETER, 1974. Induction of photo-esporogenesis in *Macrophomina phaseoli* by an octadecenoic acid from peanuts. Phytochemistry, 13:1027-1029. (In: Review of Plant Pathology, 1975 54:60).
- REIS, E.M., 1973. Efeito da concentração de inóculo de *Colletotrichum dematium* f. *truncata* (Schnw.) Von ARX na reação de variedades de soja (*Glycine max* (L.) Merr.). Piracicaba, ESALQ/USP, 48p. (Tese de mestrado).

- ROGER, L., 1953. Phytopathologie des pays chauds. Vol.II. Paris, Paul Lechevaliers Éditeur, P.1129-2256.
- SACKSTON, W.E., 1969. *Sclerotium bataticola* on seeds of cow pea (*Vigna sinensis*). Plant Disease Reporter, 53:438-439.
- SINCLAIR, J.B. e L.E. GRAY, 1972. Three fungi that can reduce soybean yields. Illinois Research, 14:5.
- SINGH, R.S. e J.S. CHOCHAN, 1972. Studies on charcoal rot of cucurbits. Plant Disease Reporter, 56:115-118.
- SMITH, W.H., 1969. Germination of *Macrophomina phaseoli* sclerotia as affected by *Pinus lambertiana* root exudate. Canadian Journal of Microbiology, 15:1387-1391.
- SMITH, W.H., 1969b. Comparison of mycelial and sclerotial inoculum of *Macrophomina phaseoli* in the mortality of Pine seedlings under varying soil conditions. Phytopathology, 59:379-381.
- SULAIMAN, M. e B.C. PATIL, 1966. Existence of physiological races of *Macrophomina phaseoli* causing root rot of cotton. Beitr. trop. sub trop. landwirtsch. Tropenveterinarmedizin, 4(3):291-298. (In: Review of Applied Mycology, 1967, 46:311)

THIRUMALACHAR, M.J., 1953. Pycnidial stage of charcoal rot inciting fungus with a discussion on its nomenclature. Phytopathology, 43:608 - 610.

THIRUMALACHAR, M.J., 1955. Incidence of charcoal rot of potato in Bihar (India) in relation to cultural conditions. Phytopathology, 45:91-93.

TUITTE, J., 1969. Plant Pathological Methods. Fungi and bacteria. Minneapolis, Burgess Publishing Company, 239 pp.

WALKER, J.C., 1965. Use of Environmental factors in screening for disease resistance. Annual Review of Phytopathology, 3:197-208.

WYLLIE, T.D. e O.H. CALVERT, 1969. Effect of flower removal and pod set on formation of sclerotia and infection of *Glycine max* by *Macrophoma phaseoli*. Phytopathology, 59:1243-1245.

WYLLIE, T.D., 1974. Worst soybean disease. Crop and Soils Magazine, 27 (1):10-11.