PATOSSISTEMA CAUPI X *Macrophomina phaseolina*: MÉTODO DE DETECÇÃO EM SEMENTES, ESPORULAÇÃO E CONTROLE DO PATÓGENO

CÂNDIDO ATHAYDE SOBRINHO

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo – Brasil
Dezembro – 2004

PATOSSISTEMA CAUPI X *Macrophomina phaseolina*: MÉTODO DE DETECÇÃO EM SEMENTES, ESPORULAÇÃO E CONTROLE DO PATÓGENO

CÂNDIDO ATHAYDE SOBRINHO

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **JOSÉ OTÁVIO MACHADO MENTEN**

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo – Brasil
Dezembro – 2004

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Athayde Sobrinho, Cândido
Patossistema caupi x *Macrophomina phaseolina*: método de detecção em sementes, esporulação e controle do patógeno / Cândido Athayde Sobrinho. - - Piracicaba, 2004.
147 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.
Bibliografia.

1. Caupi 2. Esporulação 3. Fitossanidade 4. Fungo patogênico 5. Patógeno 6. Pesticida 7. Podridão cinzenta do caule 8. Resistência genética vegetal 9. Semente I. Título

CDD 635.652

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

A minha esposa: **Elmarene Silva Athayde** e aos nossos filhos, **Gustavo, Ludmila e Geórgia**, luzes a clarearem minha existência.

Dedico

A meus pais: **Edgar** e **Socorro**
e meus irmãos:
Mauro, Cláudia, Márcia, Inêz e Edgar Júnior. Pela crença na minha capacidade realizadora e pelas silenciosas vibrações de apoio.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e pelo aporte de luz ao longo destes anos.

Ao Professor Dr. José Otávio Machado Menten pela orientação oportuna, disponibilidade constante e exemplo de equilíbrio. Obrigado por viabilizar meu crescimento profissional.

Aos amigos da Pós-Graduação Kátia Brunelli, Leonardo Cavalcanti e Paulo de Tarso, pela ajuda na construção do conteúdo deste trabalho e pelo companheirismo durante estes quatro anos.

À amiga Maria Heloísa Duarte Moraes pela amizade, ensinamentos e exemplo de disponibilidade e companheirismo.

Aos professores José Júlio da Ponte e Maria Menezes por terem me incentivado a seguir em frente, acreditando no meu potencial.

Aos professores do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ-USP pelos conhecimentos transmitidos ao longo do Curso.

Aos amigos da Embrapa Meio-Norte, Milton José Cardoso, Francisco Rodrigues Freire Filho, Valdenir Queiroz Ribeiro, Maria Pinheiro Fernandes Corrêa e Paulo Henrique, pela ajuda na coleta e envio das amostras de sementes, sem as quais esse trabalho não poderia ter sido realizado.

Aos amigos do Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia Cris, Adriana, Diogo, Taís, Daniel, pela verdadeira amizade, convívio e crescimento profissional.

Aos amigos Nildo e Marcos Emanuel pelas valiosas orientaçãoes acerca do manejo de irrigação usado nos experimentos.

Aos colegas do curso de pós-graduação em fitopatologia pela amizade e atenção.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, Fernanda, Rodolfo, Marina, Jefferson, Sr. Pedro, Marise, Sílvia e Edivaldo, pela disponibilidade, ensinamentos e pela amizade.

À biblioteconomista Eliana pela competente revisão.nas referências bibliográficas

A EMBRAPA pela oportunidade deste treinamento.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo, bem como pelo auxílio financeiro à condução desta pesquisa.

GRATIDÃO ESPECIAL

Ao Genésio e à Peteca, MEUS SEGUNDOS PAIS, por me cederem o seu exemplo e por terem sido meu sustentáculo durante a fase mais bela da minha vida. Com eles, descobri os verdadeiros valores da existência. À Peteca, em especial, pelo seu carinho de mãe, dividindo comigo o afeto de seus filhos, Maria Eugênia (Gegê), Eduardo, Paulo, Mary Ane, Marquinhos e Daniel (Dandan). A todos, minha eterna gratidão.

SUMÁRIO

Página

RESUMO..... x

SUMMARY..... xii

1 INTRODUÇÃO..... 1

2 REVISÃO DE LITERATURA..... 6

2.1 A cultura do caupi 6

2.2 O patógeno *Macrophomina phaseolina* 8

2.3 A podridão cinzenta do caule do caupi 10

2.4 Fungos em sementes de caupi com ênfase a *M. phaseolina*..... 11

2.5 Método de detecção de fungos em sementes 13

2.6 Controle da podridão cinzenta do caule 16

2.6.1 Resistência induzida 16

2.6.2 Controle genético de *M. phaseolina*..... 19

3 EMPREGO DE RESTRIÇÃO HÍDRICA EM TESTE DE SANIDADE DE SEMENTES DE CAUPI 23

Resumo 23

Summary 24

3.1 Introdução 25

3.2 Material e Métodos 27

3.2.1 Avaliação do efeito dos restritores hídricos e do congelamento sobre as sementes e sobre a detecção de fungos 27

3.2.2 Avaliação por imagens de raios-X do efeito dos restritores e do congelamento sobre as sementes 29

3.3 Resultados e Discussão 30

3.3.1 Efeito na germinação 30

3.3.2 Efeito na incidência de microrganismos 32

3.3.3 Alterações morfológicas internas nas sementes 38

3.4 Conclusões 41
4 EFEITO DA RESTRIÇÃO HÍDRICA NA DETECÇÃO DE *M. PHASEOLINA*..... 42
Resumo 42
Summary 43
4.1 Introdução 44
4.2 Material e Métodos 46
4.3 Resultados e Discussão 48
4.3.1 Efeito na germinação 48
4.3.2 Efeito na incidência de *M. phaseolina* 50
4.4 Conclusões 52
5 DETECÇÃO DE *MACROPHOMINA PHASEOLINA* EM AMOSTRAS DE SEMENTES DE CAUPI ORIUNDAS DAS REGIÕES NORTE E NORDESTE DO BRASIL 53
Resumo 53
Summary 54
5.1 Introdução 54
5.2 Material e Métodos 56
5.3 Resultados e Discussão 57
5.4 Conclusões 64
6 EFEITO DE DISCOS FOLIARES DE DIFERENTES HOSPEDEIROS SOBRE A ESPORULAÇÃO DE *M. PHSEOLINA* 65
Resumo 65
Summary 66
6.1 Introdução 66
6.2 Material e Métodos 69
6.3 Resultados e Discussão 70
6.4 Conclusões 75
7 CONTROLE DE *Macrophomina phaseolina* ATRAVÉS DA APLICAÇÃO DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA NAS SEMENTES..... 76
Resumo 76
Summary 76
7.1 Introdução 77
7.2 Material e Métodos 79
7.3 Resultados e Discussão 81
7.4 Conclusões 85
8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS INDUZIDAS POR ACIBENZOLAR-S-METIL NO PATOSSISTEMA CAUPI X *Macrophomina phaseolina*..... 86

Resumo 86
Summary 86
8.1 Introdução 87
8.2 Material e Métodos 89
8.3 Resultados e Discussão 92
8.3.1 Atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) 92
8.3.2 Atividade da peroxidase 96
8.3.3 Atividade da quitinase 99
8.3.4 Atividade de ß-1,3-glucanase 101
8.4 Conclusões..... 103
9 REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE CAUPI A *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. 105
Resumo 105
Summary 105
9.1 Introdução 106
9.2 Material e Métodos 108
9.3 Resultados e Discussão 110
9.4 Conclusões..... 114
10 CONCLUSÕES GERAIS 115
ANEXOS 117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 122

PATOSSISTEMA CAUPI X *Macrophomina phaseolina*: MÉTODO DE DETECÇÃO EM SEMENTES, ESPORULAÇÃO E CONTROLE DO PATÓGENO

Autor: CÂNDIDO ATHAYDE SOBRINHO
Orientador: Prof. Dr. JOSÉ OTÁVIO MACHADO MENTEN

RESUMO

Apesar da espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. ser bastante rústica e estar adaptada às condições adversas de clima e solo brasileiros, seu rendimento é muito baixo. Diversas causas têm sido levantadas para explicar esse comportamento; entre elas destacam-se as doenças fúngicas, sobretudo aquelas cujos patógenos são transmitidos por sementes, em especial a podridão cinzenta do caule, causada por *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. A abordagem analítica desse patossistema revelou alguns problemas emergentes. Entre eles, destacam-se: a) desconhecimento da qualidade sanitária das sementes de caupi, utilizadas para semeadura; b) desunifomidade na metodologia usada para detectar os patógenos presentes nas semente; c) dificuldade na esporulação do patógeno, máxime de alguns isolados reticentes em esporular em meios artificiais de cultivo, cujo comportamento dificulta os trabalhos de seleção de genótipos resistentes; d) carência de medidas de

controle do patógeno, que empreguem práticas naturais, como uso de sementes sadias, de indutores de resistência e de cultivares resistentes, de fácil uso e passível de adoção por parte dos produtores. Na estruturação da matriz lógica do presente estudo, referidos problemas foram transformados em objetivos. Os trabalhos foram conduzidos no Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP, em Piracicaba-SP. Os resultados indicaram o teste de sanidade de sementes de caupi empregando o método do papel de filtro com restrição hídrica utilizando NaCl a –0,8Mpa, como o mais adequado para detecção dos fungos presentes nas sementes de caupi, especialmente *M. phaseolina*. A análise sanitária das amostras de sementes originadas de vários estados brasileiros revelou que, em 62% das amostras analisadas, o fungo *M. phaseolina* estava presente, sendo as amostras originadas do estado da Paraíba, Piauí, Pará e Bahia as que apresentaram maiores níveis de incidência do patógeno. Os melhores níveis de esporulação do patógeno foram conseguidos com a combinação de sobreposição de discos de folhas de trigo ao meio BDA, com temperatura de 25°C. Quanto à identificação de indutores de resistência, capazes de controlar *M. phaseolina*, os resultados revelaram que o acibenzolar-S-metil (ASM) foi o mais eficiente, quando comparado com quitosana e com um produto silicatado derivado de rocha micronizada (PSiM), apresentando um controle residual por mais de 40 dias após a semeadura. A maior eficiência verificada pelo ASM ocorreu devido a sua capacidade de ativar mecanismos bioquímicos de defesa, configurando-se em efetivo ativador da resistência induzida nas plantas de caupi, por atuar na cinética de importantes enzimas relacionadas à defesa, como a fenilalanina amônia-liase, peroxidase e quitinase. Quanto à reação de cultivares de caupi à doença, foi possível verificar razoável nível de resistência de algumas cultivares, tendo sido consideradas resistentes Mulato, Guariba e Maratauã.

THE PATHOSYSTEM COWPEA X *Macrophomina phaseolina*: DETECTION IN SEEDS, ESPORULATION AND PATHOGEN CONTROL

Author: CÂNDIDO ATHAYDE SOBRINHO
Adviser: Prof. Dr. JOSÉ OTÁVIO MACHADO MENTEN

SUMMARY

Notwithstanding the specie *Vigna unguiculata* (L.) Walp is sufficiently rustic and adapted to the adverse conditions of the Brazilian soil and climate, its improvement is very low. Many causes have been raised in order to explain such behavior; among them the fungal diseases stand out, over all those whose pathogens are transmitted by the seeds especially the charcoal rot disease caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. The analytical approach of such pathosystem has revealed some emerging problems. Among them, it stands out: a) the ignorance of the sanitary quality of the cowpea seeds used for sowing; b) the non-uniformity in the used methodology in order to detect the pathogens, which are present in the seed; c) the difficult in pathogen sporulation, principally of some isolated reticent in forming spores in cultivation artificial environments whose behavior hampers the selection works of the resistant genotypes; d) lack of pathogen control measures, which utilize natural practices, such as the use of healthy seeds, resistance inducers and resistant

cultivars of easy utilization and liable to adoption by the producers. In structuring the logical matrix of this study, such problems were transformed into objectives. The works were conducted at the Entomology, Phytopathology and Agricultural Zoology Departments of ESALQ/USP, in Piracicaba-SP. The results have pointed out the sanity test of the cowpea seeds through the method of filter paper with hydric restriction using NaCl – 0,8Mpa, as the most suitable for detecting the current fungus in cowpea seeds, especially *M. phaseolina.* The sanitary analysis of the seeds samples originated from several Brazilian states has revealed that in 63% of the analyzed samples, the fungus *M. phaseolina* was present, and the samples originated from the states of Paraíba, Piauí, Pará and Bahia were those that have presented higher incident levels of pathogen. The best levels of sporulation were obtained with the combination of the superposition of wheat leaves disks in the middle of BDA in 25ºC. As to the identification of the resistance inducers, capable of controlling the *M. phaseolina*, the results have revealed that the acinbezolar-S-methyl (ASM) was more efficient when compared to chitosan and with a silicate product originated from micronized rock (PsiM), presenting a residual control for more than 40 days after the sowing. The greatest efficiency ascertained by ASM has occurred due to its capacity of activate the defense biochemistries mechanisms, forming itself in an activator effect of the induced resistance in cowpea plants because it acts in the kinetic of important enzymes related to the defense, such as the phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and chitinase. As to the cowpea cultivars reaction to the disease, it was possible to ascertain a reasonable resistance level of some cultivars, and BR 14 Mulato, Guariba e Marataua̧ were considered as resistant.

1 INTRODUÇÃO

O caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), também conhecido como feijão-de-corda, feijão-de-macassar (ou macáçar) e feijão fradinho, é uma leguminosa comestível, dotada de alto teor protéico, elevada capacidade de fixar nitrogênio, rústico e pouco exigente em fertilidade do solo (Miranda et al., 1984; Guazzelli, 1988), que se constitui na principal fonte de proteína para as populações situadas nas áreas mais pobres da região Norte e Nordeste do Brasil.

A área cultivada com caupi no Brasil é, aproximadamente, 1 milhão de hectares, dos quais cerca de 900 mil (90%) estão situados na Região Nordeste do Brasil (Frota & Pereira, 2000). Desse total, menos de 0,5% é implantado a partir de sementes fiscalizadas ou certificadas (Freire Filho[1]). Estima-se que o Brasil contribui com 26% da produção mundial e 82% da produção do continente americano (Araújo & Watt, 1988).

Em que pese o "negócio caupi" render, anualmente, algo em torno de R$ 250 milhões (Freire Filho & Ribeiro, 2000), muito pouco se tem conseguido para melhorar o desempenho da atividade. Isso pode ser verificado pelos baixos rendimentos da cultura. De acordo com dados do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (2002), o rendimento médio do caupi, para o supracitado ano, foi de 332 kg/ha, muito abaixo do potencial produtivo da cultura que é superior a 2.500 kg/ha (Cardoso et al.,1995; Freire Filho et al., 1997; Cardoso, 2000).

---

[1] FREIRE FILHO, F.R. Comunicação pessoal, 2000.

As doenças têm sido destacadas como uma das principais responsáveis pelos baixos índices de desempenho da cultura (Araújo, 1988; Rios, 1988; Lima & Santos, 1988; Ponte, 1996; Pio-Ribeiro & Assis Filho,1997). Entre elas, destaca-se a podridão cinzenta do caule, causada por *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. que, nas condições do Nordeste brasileiro, representa uma das mais importantes doenças fúngicas (Araújo, 1985; Rodrigues et al., 1997b; Athayde Sobrinho et al., 1998; Athayde Sobrinho et al., 2000), causando morte de sementes e plântulas, cancro e lesões cinzentas no caule, sobretudo em condições de alta temperatura e deficiência hídrica (Pio-Ribeiro & Assis Filho, 1997).

Uma característica importante do fungo *M. phaseolina* é a dificuldade que alguns isolados apresentam em esporularem abundantemente em meios artificiais. Essa característica tem dificultado os estudos relacionados à patogenicidade e, conseqüentemente, a identificação de fontes de resistência, em que a presença de conídios viáveis é fundamental (Lutrell, 1946; Walker, 1965). O problema tem sido solucionado por meio da indução artificial da esporulação, graças à adição, ao meio de crescimento, de extratos ou partes de plantas hospedeiras (fragmentos de folhas, caules, raiz etc.) (Goth & Ostazeski, 1965; Chidambaram & Mathur, 1975; Srinivasan et al., 1971; Machado, 1980). Em que pese muitas tentativas terem dado resultado, outras não surtiram o efeito desejado (Dhingra & Sinclair, 1978), uma vez que alguns isolados permanecem reticentes em esporularem. Isso tem demandado por mais estudos relativos à fisiologia da reprodução do fungo.

Trabalhos enfatizando a transmissão, por sementes, de agentes causais de importantes doenças em diversas espécies vegetais, estão disponíveis em quantidades relativamente altas (Barros, 1980; Araújo, 1985; Araújo & Rosseto, 1987; Menten & Bueno, 1987; Moraes & Soave, 1987; Porto, 1987; Tanaka, 1987; Tenente & Manso, 1987; Ponte, 1996). Todavia, a literatura relativa à sanidade de sementes de caupi nas condições do Brasil, é escassa, e certa ênfase pode ser dada aos trabalhos de Bolkan et al., (1978), Barros (1980),

Barros & Menezes (1981), Oliveira (1981), Araújo (1985) e Choudhury (1987), onde os autores destacaram a ocorrência de diversos fungos em associação com a espécie. Com efeito, a análise crítica desses trabalhos demonstra grande variação na metodologia empregada na detecção.

De acordo com Choudhury (1987), os procedimentos para detecção de fungos, bactérias e vírus em sementes de caupi não estão padronizados, e esta realidade, constitui-se em empecilho a uma melhor compreensão do estado sanitário das sementes usadas pelos produtores.

Para o controle de doenças vegetais tem sido recomendado, em muitas culturas, a utilização de genótipos resistentes e também o emprego de fungicidas, cujo uso teve grande impulso, sobretudo na segunda metade do século passado, quando os mesmos representaram uma das mais importantes ferramentas da revolução verde.

Não obstante a existência de fungicidas eficientes no controle de muitos fungos que acometem também a cultura do caupi, seu uso é plenamente limitado, em função da inexistência de registro oficial desses produtos para essa espécie. Diante dessa realidade, torna-se da maior importância o desenvolvimento de produtos e de métodos alternativos de controle que sejam eficazes e seguros ao agricultor e ao meio ambiente.

Para preencher tal lacuna, tem-se como opção viável o controle das doenças através da resistência induzida (Latunde-Dada & Lucas, 2001), além do já conhecido melhoramento genético para resistência, que tem possibilitado o desenvolvimento de genótipos resistentes aos principais patógenos da cultura (Rios, 1988; Ponte, 1996; Rodrigues et al.,1997b; Freire Filho et al., 1997).

No âmbito da resistência induzida, estão sendo utilizadas várias substâncias naturais e/ou sintéticas no controle de importantes agentes de doenças em vários patossistemas (Moraes, 1998; Cavalcanti, 2000; Oliveira et al., 2004). Dentre as sintéticas, destacam-se o ácido salicílico (AS), o ácido 2,6-dicloroisonocotínico (INA) (Kessmann et al., 1994) e, especialmente o acibenzolar-S-metil (ASM) (Kessmann & Ryals, 1996), cujo emprego comercial

tornou-se uma realidade em muitos países (Görlach et al., 1996). Relativamente às moléculas naturais, maior ênfase tem sido dada àquelas derivadas de parede celular de patógenos, como glucanas, quitina (e seus derivados), glicoproteínas e peptídeos (Hann, 1996). Um outro grupo de substâncias é representado pelo silício, oriundo de rochas magmáticas, ou de escórias de siderurgia, atualmente bastante estudado por sua capacidade de controlar doenças de plantas (Cherif et al., 1992; Samuels et al., 1994) e de promover resistência induzida (Pozza et al., 2004).

Estudos têm mostrado a eficiência da resistência induzida no controle de patógenos em vários patossistemas (Oliveira et al., 2004; Pozza et al., 2004). Todavia, os trabalhos especificamente relacionados à cultura do caupi são bastante escassos, sendo o de Latunde-Dada & Lucas (2001), a única referência encontrada, em cujo teor é destacada a eficácia do ASM no controle de *Colletotrichum destructivum*.

No que diz respeito ao desenvolvimento e uso de genótipos resistentes no manejo das doenças, Kimati & Bergamin Filho (1995) e Camargo & Bergami Filho (1995) destacam o emprego de cultivares resistentes como uma das mais importantes medidas de controle. Em muitas espécies de importância econômica têm sido identificadas fontes de resistência ao fungo *M. phaseolina*, a exemplo do verificado para o feijoeiro (Cardoso, 1994; Coelho Neto & Dhingra, 1996; Perez, 1998; Maringoni & Lauretti, 1999; Mayek-Perez et al., 2001).

Relativamente à cultura do caupi, os trabalhos relacionados às fontes de resistência genética a *M. phaseolina* são escassos. Entretanto, vale destacar os de Rodrigues et al. (1997a), bem como a citação de Pio-Ribeiro & Assis Filho (1997), os quais enfatizam a existência de variabilidade no comportamento de alguns genótipos à podridão cinzenta do caule, com indicação clara de fontes de resistência ao patógeno.

Assim, os objetivos deste trabalho foram: 1) definir metodologia para detecção de fungos em sementes de caupi, com ênfase a *M. phaseolina*; 2)

promover um levantamento da presença de *M. phaseolina* em 119 amostras de sementes de caupi, provenientes das regiões Norte e Nordeste do Brasil; 3) identificar condições ideais de esporulação de isolados do patógeno de difícil esporulação em meios artificiais; 4) avaliar a eficiência do uso, via semente, de indutores de resistência no controle de *M. phaseolina* e 5) identificar fontes de resistência genética ao patógeno em algumas cultivares de caupi, integrantes da coleção de germoplasma da Embrapa Meio-Norte.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do caupi

O caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), também conhecido como feijão-de-corda e feijão-de-macassar, feijão macacar e feijão fradinho, representa uma das mais importantes espécies cultivadas a fornecer proteína de boa qualidade a uma expressiva parte da população brasileira, notadamente àquela situada na Região Nordeste do país.

Analisando-se o cenário da produção nesta Região, dadas as freqüentes ocorrências de insuficiência pluviais, o caupi, pelas suas características de ciclo curto e tolerância a estresse hídrico, ocupa ainda especial relevância na composição da renda familiar dos agricultores. Isto, em função das menores ocorrências de perdas observadas e da ocupação de mão-de-obra em períodos sazonais, como é o caso do cultivo em segunda safra, com o aproveitamento de várzeas irrigáveis (Frota & Pereira, 2000)

De acordo com Freire Filho & Ribeiro (2000), a cadeia produtiva do caupi gera, anualmente, algo em torno de R$ 250 milhões, basicamente como resultado de uma área cultivada de aproximadamente 1 milhão de hectares, dos quais cerca de 900 mil estão situados no Nordeste brasileiro. (Frota & Pereira, 2000).

O caupi é predominantemente cultivado como cultura de verão, estando sua semeadura concentrada no início da estação chuvosa. Na Região Nordeste, a semeadura ocorre, para cultivo de primeira safra, nos meses de dezembro a março. A semeadura de segunda safra tem maior ocorrência no

Aperíodo de abril a agosto, concentrando 54,82% nos meses de maio e junho. Relativamente ao tipo de cultivo predominante, e tomando como referência regional a região Meio-Norte cujas informações são mais detalhadas, percebe-se que, na semeadura de primeira safra, 65,5% apresenta cultivo intercalado com milho, enquanto que na segunda safra, o monocultivo predomina em 80% das áreas (Frota & Pereira, 2000).

Para Frota & Pereira (2000), a produção de caupi é, em sua maioria, conduzida por pequenos agricultores. Aproximadamente 62% dos produtores, em cultivos de primeira safra, utilizam propriedades com menos de 10 ha. Propriedades com áreas entre 10 - 100 ha são utilizadas somente por 31% dos produtores. Considerando-se o cultivo em segunda safra, 99,3% dos produtores que adotam esse sistema o fazem em propriedades menores que 10 ha.

Em que pese a disponibilidade de informações tecnológicas relacionadas a muitos aspectos da exploração da cultura, o uso de tecnologia é muito baixo, o que se traduz em baixos índices de rendimento e de qualidade do produto. Isso pode ser exemplificado pela baixa taxa de adoção de sementes melhoradas no sistema de produção. De acordo com Freire Filho[2], menos de 0,5% da área plantada é feita empregando-se sementes melhoradas.

Desta forma, a realidade da cadeia produtiva da cultura poderia ser bem mais alvissareira, não fosse o baixo rendimento obtido pelo atual sistema de produção. Conforme dados do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (2002), o rendimento médio da espécie, para o ano em análise, foi de 332 kg/ha, muito abaixo do potencial da cultura que é superior a 2.500 kg/ha (Cardoso et al., 1995; Freire Filho et al., 1997; Cardoso et al., 2000).

As causas determinantes desse baixo rendimento são várias e vão desde aquelas relacionadas com o perfil sócio-econômico do produtor até aquelas associadas ao modelo tecnológico empregado. Todavia, as doenças representam um peso significativo, constituindo-se em um dos principais

[2] FREIRE FILHO, F.R.. Comunicação pessoal, 2000.

fatores limitantes à expansão dos rendimentos (Rios, 1985; Athayde Sobrinho et al., 2000).

2.2 O patógeno *Macrophomina phaseolina*

O fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. tem sido descrito taxonomicamente em vários outros gêneros, entre os quais destacam-se *Rhizoctonia* (*R. bataticola*), *Sphaeronema* (*S. fimbriatum* = *Ceratocystis fimbriata*) e *Sclerotium* (*S. bataticola*). Provavelmente, essa variação tenha ocorrido em função de o fungo apresentar estádio esclerocial e picnidial bem definidos. Por conta do tamanho dos esclerócios, modo de formação dessas estruturas, taxa de crescimento micelial e notabilidade da constrição basal tentaram-se criar as subspécies *"typica"*, *"sesamica"* e *"intermedia"*. Todavia, em virtude de alta variabilidade e ampla gama de hospedeiros, tal subespecialização tem sido pouco aceita (Dhingra & Sinclair, 1978).

Conforme Dhingra & Sinclair (1978), o estádio picnidial do fungo foi relatado antes da forma esclerocial. Assim, Tassi descreveu o fungo pela primeira vez, denominando-o de *Macrophoma phaseolina* e Maublanc, concomitantemente, denominou-o de *Macrophoma phaseoli*. Posteriormente, o gênero *Macrophoma* foi revisado por Petrak que o tornou mais homogêneo, tendo, também, redescrito o novo gênero *Macrophomina* para acomodar espécies não estromáticas. Por sua vez, Ashby relatou os estádios picnidial e esclerocial, denominando o primeiro como *Macrophomina phaseoli*, sem ter conhecimento de que Tassi havia feito a primeira descrição do fungo. Por último, Goidanish redenominou-o como *M. phaseolina*, baseando-se na descrição anterior de Tassi. Atualmente, *M. phaseolina* é a nomenclatura válida para o referido fungo.

Dessa forma, a espécie *M. phaseolina* está ordenada na Subdivisão Deuteromycotina e à Família Sphaeropsidaceae (Sutton 1980; Menezes & Oliveira 1993), sendo a única espécie representante do gênero *Macrophomina*.

De natureza polífaga e cosmopolita, a espécie *M. phaseolina*, através de sua ação patogênica, tem sido verificada sobre inúmeras espécies de plantas cultivadas, entre as quais destacam-se: milho (*Zea mays* L.), soja [*Glycine max* (L.) Merril], gergelim (*Sesamum indicum* L.), amendoim (*Arachis hypogea* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], entre outras (Machado, 1980; Sinhg et al.,1990; Mihail, 1992). Para quase todas essas espécies, o fungo é eficientemente transmitido por sementes (Andrus , 1938; Toledo & Marcos Filho 1977; Dinghra & Sinclair, 1978; Barros, 1980; Mohan et al., 1983; Oliveira, 1984; Santos et al.,1984).

Neste contexto, vale destacar que diversas espécies transmitidas por sementes, quando isoladas e cultivadas artificialmente, perdem, com freqüência, a capacidade de esporulação (Srinivasan et al.,1971). Por outro lado, a presença de conídios viáveis é fundamental para possibilitar estudos inerentes aos diversos aspectos relacionados com a patogenicidade (Lutrell, 1946; Walker, 1965), bem como identificar e desenvolver fontes de resistência à doença por ele provocada.

Muitos isolados de *M. phaseolina* são de difícil esporulação e vários pesquisadores têm se utilizado de recursos alternativos, visando dirimir o problema, a exemplo do uso de extratos ou partes de plantas hospedeiras (fragmentos de folhas, caules, raiz etc.) adicionados ao meio de cultura (Ostazeski, 1964; Goth e Ostazeski, 1965; Chidambaram & Mathur, 1975; Srinivasan et al., 1971; Machado, 1980). Em que pese muitas tentativas terem dado resultado, outras não surtiram o efeito desejado (Dhingra & Sinclair, 1978).

Athayde Sobrinho et al. (2003), trabalhando com isolados de *M. phaseolina*, destacaram a dificuldade em inocular as plantas de caupi com o patógeno, devido à ausência de produção de conídios em cultivos artificiais.

Para a obtenção abundante de conídios de *M. phaseolina* é muito importante levar em consideração os fatores ambientais interferentes neste processo.

Chidambaram & Mathur (1975) destacaram que o substrato de crescimento, o fotoperíodo e a qualidade da luz constituem fatores decisivos no processo reprodutivo de *M. phaseolina*. O fator luz foi considerado por Dhar et al. (1991) e Machado (1980) como um dos mais importantes fatores da esporulação.

2.3 A podridão cinzenta do caule do caupi

A podridão cinzenta do caule foi observada, pela primeira vez no Brasil, em 1935, em feijão comum, no município de Campinas-SP, por Bittancourt (Coelho Neto, 1994).

Trata-se de uma doença de caule e raiz, comumente encontrada em muitos países da América e África, causando severos prejuízos (Abawi & Pastor-Corrales, 1990).

O agente causal da podridão cinzenta do caule é o fungo *M. phaseolina* que apresenta uma ampla gama de plantas hospedeiras e vasta distribuição geográfica (Machado, 1980; Sinhg et al.,1990; Mihail, 1992;)

Nas condições do Brasil, a doença está presente em todas as áreas produtoras (Rios, 1988; Ponte, 1996; Pio-Ribeiro & Assis Filho, 1997; Athayde Sobrinho et al., 1998; Athayde Sobrinho et al., 2000) e, conforme Magalhães et al. (1982) e Pio-Ribeiro & Assis Filho (1997) torna-se mais severa quando as condições ambientes mostram-se secas e com temperaturas elevadas.

De acordo com Ponte (1996) e Rodrigues et al. (1997a), a infecção por *M. phaseolina* em caupi ocorre em diversas fases de crescimento da planta. Nas plântulas, os sintomas são observados nos cotilédones, podendo causar, também, tombamento de pré e pós-emergência. Dingra & Sinclair (1978) observaram, na planta adulta, presença de lesões necróticas na região do colo, amarelecimento, murcha, desfolhamento prematuro e morte da planta.

Ponte (1996) e Athayde Sobrinho et al. (2000) destacaram, para as condições do Nordeste brasileiro, que a doença se manifesta, inicialmente no

colo, atingindo, posteriormente a raiz pivotante, as partes superiores do caule e ramos primários, onde são observadas lesões acinzentadas, difusas, de aspecto úmido, que evoluem para intensa podridão dos tecidos. Associado à desestruturação dos tecidos, sobrevêm um amarelecimento generalizado, murcha, seca e morte das plantas. Tais expressões sintomatológicas são verificadas quando não ocorre morte de sementes, nem tombamento de pré-emergência, o que também é bastante comum. Com isso, na dependência da cultivar utilizada, observa-se significativa redução da população ideal de plantas (50.000 a 90.000 plantas/ha), com reflexos diretos no rendimento da cultura (Cardoso et al., 2000).

2.4 Fungos em sementes de caupi com ênfase a *M. phaseolina*

Muitos fungos estão associados às sementes interna e/ou externamente e, na maioria das vezes, contribuem para um baixo poder germinativo das mesmas (Barros, 1981; Machado, 1987). A associação patógeno-semente constitui séria ameaça para a agricultura, porquanto, a semente portadora, funcionando como fonte de inóculo, garante a sobrevivência temporal e a disseminação espacial de patógenos. Através delas, os agentes de doenças podem ser introduzidos em áreas isentas de ocorrência fitossanitária (Vechiato et al., 1997).

Sackston (1969) isolou *Sclerotium bataticola* (=*M. phaseolina*) de sementes de caupi, após desinfestação das sementes, demonstrando desse modo, que as mesmas transportavam o patógeno internamente.

Onesirosan (1975) identificou a presença de *Rizoctonia solani* que se mostrou patogênico, postulando que as sementes infectadas constituíam-se importante fonte de inóculo no campo.

Williams (1975) destacou a transmissão de *Cercopora* spp. através de sementes de caupi, nas condições da Nigéria. Relativamente a esse mesmo fungo, Menten (1982), analisando a flora fúngica de sementes de caupi,

originárias do Estado do Pará, encontrou uma percentagem de apenas de 0,4 % de sementes infectadas com o patógeno.

Bolkan et al. (1978) detectaram, em 43 variedades de feijão comum e feijão caupi, um total de 25 gêneros de fungos pertencentes a diferentes classes, enfatizando, ainda, que *Fusarium* spp, *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Alternaria alternata*, *M. phaseolina*, *R. solani* e *Phomopsis sojae* como os microrganismos mais freqüentemente detectados.

Barros (1980) e Barros & Menezes (1981), estudando 23 variedades de caupi nas condições do estado de Pernambuco, identificaram a presença de 32 fungos em associação com as sementes dessas variedades, observando significativa variação no padrão sanitário.

Oliveira (1981), analisando amostras de sementes de 18 cultivares de caupi, colhidas em vários Estados do Brasil, identificou um total de 17 gêneros de fungos pertencentes às classes dos Deuteromicetos, Ascomicetos e oomicetos, entre os quais destaca como patogênicos os percentes às espécies *M. phaseolina, Phomopsis sojae* e *F. oxysporum*.

Richardson (1983) registrou a presença de diversos patógenos em associação às sementes de *V. unguiculata*, onde cita a ocorrência de vários gêneros fúngicos de importância para a cultura, por serem responsáveis por doenças de importância econômica em condições de campo.

Araújo (1985) destacou que cerca de 70 espécies de fungos já foram assinaladas no Brasil, em diversos Estados. Para o autor, algumas delas são transmitidas pelas sementes e tiveram sua patogenicidade comprovada, a exemplo de *Curvularia lunata, Fusarium semitectum, Colletotrichum lindemuthianum, F. oxysporium* f.sp*. phaseoli, Colletotrichum dematium, M. phaseolina* e *Phoma sojae*.

Choudhury (1987) listou os microorganismos transmitidos através de sementes de caupi nas condições do Brasil. Para o autor, os mais importantes são: *R. solani*, *M. phaseolina*, *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*, *F. oxysporum* f.

sp. *tracheiphilum*, *Pseudocercospora cruenta*, *C. lindemuthianum* e *Sphaceloma* sp.

Nakawura et al. (1997), trabalhando com 56 amostras de sementes de caupi, nas condições de Uganda, África, observaram a presença de 12 espécies diferentes de fungos associadas às sementes. Os autores destacam as espécies *F. semitectum*, *Hainesia lytri*, *Phoma* sp., *Phomopsis* sp. e *M. phaseolina* como as mais freqüentes.

Smith et al. (1999) descreveram, nas condições da África do Sul, a presença de *C. dematium* infectando, em taxas que variaram de 1,75 % a 7,5% sementes de diversas cultivares de caupi, indicando que a germinação foi significativamente afetada pela presença do patógeno.

Athayde Sobrinho et al. (1998) observaram incidência de 45-95% de *M. phaseolina* em sementes de caupi, considerando a cultivar e o nível de infecção das plantas, em condições de campo.

Nas condições do Egito, Abdelmonem (2000) destacou a presença de *M. phaseolina* em associação com as sementes de caupi, em um contexto onde os patógenos de sementes estão entre os principais responsáveis pelas perdas de produção.

2.5 Métodos de detecção de fungos em sementes

Para detecção de fungos, diversos trabalhos, mostrando alguns métodos, têm sido publicados. Neergaard (1979), por exemplo, no caso de sementes de feijão, recomenda, para detecção de *C. lindemuthianum*, o teste do papel de filtro e teste de plântula. Para *Corynespora. cassiicola* e *M. phaseolina*, o teste do papel de filtro e agar; para *Isariopsis* sp., papel de filtro.

Lagerberg et al. (1996) utilizaram, para detecção de *Septoria nodorum* em sementes trigo, método ELISA. Os autores demonstraram que esse método é perfeitamente exeqüível, quando comparado com o teste do papel de filtro.

Lee & Chung (1995), empregando o método de agar-água e incubando sementes por dez dias a 20-25°C, com fotofase de 12 horas claro/escuro, obtiveram resultados significativos na detecção de *C. gloeosporioides* em sementes de pimentão.

Wu & Chen (1999) propõem um novo meio semi-seletivo para detecção de *Alternaria brassicicola* em sementes de crucíferas, cuja adequação tem sido confirmada em diversos laboratórios, em diferentes países.

Relativamente à cultura do caupi, tem-se observado uma significativa desuniformidade de metodologias usadas (Araújo, 1985; Choudhrury, 1987). Assim, Bolkan et al. (1978) empregaram meio BDA, com pré-tratamento das sementes. Tal procedimento foi adotado, também, nos trabalhos realizados por Batista (1981) e Batista (1982). Choudhury (1982) não empregou pré-tratamento, mas usou luz negra, alternada com escuro total, temperatura de 25-28 °C, em um período de incubação de sete dias. Oliveira (1981) e Oliveira & Bolkan (1981) empregaram meio BDA + estreptomicina e BDA + fungicida. Oliveira & Bolkan (1982) fizeram pré-tratamento e utilizaram um período de incubação de cinco dias. Barros (1980) e Barros & Menezes (1981) empregaram o método do ágar, conjugado com a utilização de diferentes condições de luminosidade, realizando pré-tratamento de sementes e período de incubação de oito dias. Nestas condições, observaram efeito aditivo da luz na detecção de patógenos em sementes de caupi. Araújo et al.(1983) empregaram papel de filtro e desinfecção superficial das sementes, luz natural, temperatura de 22 $\pm$ 2 °C e período de incubação de oito dias.

Nos testes de sanidade de sementes pelo método do papel de filtro, a rápida germinação dificulta a identificação dos microrganismos, afetando a qualidade da análise (Machado, 1988).

Para resolver esse problema têm sido utilizados alguns recursos, os quais visam inibir o processo germinativo ou bloquear o crescimento das plântulas. Entre eles, destaca-se o congelamento das sementes, em que elas, após um período de incubação de 24 horas em câmara a 22º C, são colocadas

em “freezer” por 24 horas. Essa técnica apresenta inconveniente de requerer um maior manuseio das sementes, além de induzir o crescimento de organismos saprófitas que reduzem a qualidade da avaliação (Limonard, 1968)

Um outro recurso bastante empregado, notadamente para sementes de leguminosas, consiste no uso do herbicida 2,4-D, aplicado na água de embebição do papel de filtro. Este produto age promovendo a morte do embrião emergente. Nesse caso, o uso do herbicida também traz o inconveniente de risco para o homem e para o meio ambiente.

Visando contornar esses inconvenientes, tem sido utilizada, com sucesso, a restrição hídrica, uma vez que este recurso também inibe a germinação, sem afetar o desenvolvimento dos fungos associados às sementes (Carvalho 1999). Esta técnica tem, como princípio básico, o emprego de baixos potenciais hídricos presentes no líquido usado na embebição das sementes. Tais potenciais são normalmente conseguidos através da adição de solutos que atuam reduzindo os níveis de absorção de água, bloqueando, por conseguinte os eventos requeridos pela germinação (Bansal et al., 1980). Exemplo disso tem sido o emprego de solutos iônicos tais como NaCl, KCl e KNO_3, e não iônicos como manitol e polietileno glicol, no controle da germinação de sementes para várias espécies cultivadas (Guimarães, 1991; Braccini, 1996; Camargo, 1998).

Nesta perspectiva, analisando os benefícios que o método pode trazer para a rotina nos laboratórios de patologia de sementes, verifica-se que, no âmbito da análise das sementes de caupi, tal metodologia não foi ainda avaliada, haja vista seu emprego, com sucesso, nos testes de sanidade de sementes de outras espécies (Coutinho, 2000; Coutinho et al., 2001).

2.6 Controle da podridão cinzenta do caule

Para o controle de *M. phaseolina*, em outros patossistemas, tem sido recomendada a utilização de algumas medidas de controle. De uma maneira

geral, essas medidas podem ser direcionadas ao ambiente (evasão e regulação), ao patógeno (evasão, exclusão e erradicação) e ao hospedeiro (terapia, proteção e imunização) (Kimati & Bergamim Filho, 1995). Dentre elas, as que têm sido mais freqüentemente usadas são os fungicidas (Souza & Dutra, 2003) e também a utilização de genótipos resistentes (Lopes & Kimati, 1988a; Lopes & Kimati, 1988b; De & Kaiser, 1991; Aires, et al., 1994; Maringoni & Lauretti, 1999).

Em que pese existência de fungicidas eficientes no controle de *M. phaseolina* em outros patossistemas (Bianchini, et al., 1997; Almeida et al., 1997) sua aplicação na cultura do caupi está descartada devido a ausência de princípio ativo registrado para essa espécie. Para preencher tal lacuna, tem-se como opção viável o controle das doenças através da resistência induzida (Latunde-Dada & Lucas, 2001), além do já conhecido melhoramento genético para resistência à doença.

2.6.1 Resistência induzida

As plantas possuem um sistema de defesa ativa, o qual, normalmente, se expressa na forma de resistência induzida aos fitopatógenos e animais fitófagos. Tal fenômeno foi de grande importância estratégica para o estabelecimento da vida vegetal na superfície continental do planeta. Conforme Moraes (1998), os vegetais, por possuírem um estilo de vida sedentário e extensas estruturas aéreas e subterrâneas expostas ao rigor do ambiente, tornam-se extremamente vulnerávis à ação de microrganismos patogênicos, para os quais, literalmente, não têm mecanismos de fuga e escape. Assim, se os vegetais venceram essa luta e se estabeleceram, ocupando extensas áreas, isso se deu graças a uma combinação de respostas de defesa constitutiva (passiva) e induzida, após ação desafiadora do ambiente (Lindsay et al., 1993).

O fenômeno da resistência induzida vem, há algum tempo, sendo objeto de investigação (Sticher et al., 1997; Metraux, 2001). Todavia, ganhou “status”

próprio, se firmando como uma importante linha de pesquisa no âmbito da fisiologia e bioquímica do parasitismo, a partir da década de 1960, quando se verificou, em plantas de fumo pré-inoculadas com Vírus do Mosaico do Fumo, uma eficiente proteção contra outros vírus posteriormente inoculados (Ross, 1961). Com base nestas observações surgiu o termo resistência sistêmica adquirida (RSA) (Metraux, 2001). A partir de então, este termo tem sido empregado para designar reações sistêmicas de defesa induzida, em resposta à ação desafiadora de fatores ambientais (radiação ultravioleta, altas temperaturas etc.), substâncias químicas e microrganismos patogênicos (Ryals et al., 1996).

Com a continuidade dos estudos, observou-se que certos microrganismos não patogênicos, a exemplo das bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), também eram capazes de induzir um tipo de resistência sistêmica, cujos mecanismos bioquímicos pareciam distintos daqueles desencadeados pela RSA, do que resultou, por conta disto, a definição do termo resistência sistêmica induzida (RSI) (Pieterse & van Loon, 1999).

Não obstante as diferenças existentes em algumas vias metabólicas envolvidas com os referidos mecanismos, há uma tendência de se empregar os termos RSA e RSI como sinônimos (Metraux, 2001). Tal fato tem sido fortalecido em função do conhecimento recentemente adquirido, de que existe convergência das rotas metabólicas responsáveis pela expressão das respostas de defesa advindas dos dois fenômenos (Pieterse et al., 1998). Dessa forma, tem-se observada a opção pelo termo “resistência induzida” para designar ambos processos de resposta de defesa vegetal (Metraux, 2001).

Do ponto de vista prático, o fenômeno da resistência induzida é tangibilizado pelas alterações morfológicas e funcionais, verificadas em nível celular e histológico, que se contrapõem à ação patogênica, do que resulta a diminuição dos sintomas dela resultantes. Para tanto, estão envolvidos mecanismos relacionados à formação de barreiras estruturais e, sobretudo,

síntese de compostos de ação antimicrobiana, sendo a lignificação uma das mais importantes respostas ativas de defesa da planta (Oliveira et al., 2004). A lignificação representa o produto do acúmulo de lignina nas estruturas vegetais como parede celular, parede de vasos e nos espaços intercelulares. Sua biossíntese ocorre na via metabólica dos fenilpropanóides, na qual a fenilalanina amônia-liase (FAL) é uma enzima-chave para o início, e a peroxidase para o fechamento do processo (Buchanan et al., 2000).

Além da lignificação, outros processos resultantes da ativação de outras rotas metabólicas concorrem para ampliar o arsenal de defesa estrutural. Entre eles destacam-se a suberificação, formação de halos e papilas, além da deposição de outros compostos dentro e fora da parede celular como extensinas (glicoproteinas ricas em hidroxiprolinas), liganas, caloses, ceras, cutina, fenóis monoméricos e poliméricos, entre outros (Pascolati & Leite, 1995; Vidhyasekaran, 1997; Punja, 2001). Vale destacar, ainda, que muitos compostos precursores da lignina apresentam significativa atividade antifúngica que contribui, ativamente, com a defesa (Nicholson & Hammerschimidt, 1992, Hammerschimidt, 1999).

No âmbito das reações de respostas bioquímicas de defesa ativa, diferentemente do que é verificado com a defesa estrutural, que atua dificultando ou impedindo fisicamente a penetração/colonização do patógeno, tem-se como destaque vias metabólicas envolvidas com a síntese de proteínas relacionadas com a patogênese (proteínas-RP), fitoalexinas, inibidores de proteases e lecitinas (Sticher et al., 1997). Entre as proteínas-RP destacam-se a β-1,3-glucanase e quitinase, dotadas da capacidade de degradar a parede celular de fungos e bactérias.

O fenômeno da resistência induzida tem sido demonstrado em muitas espécies de plantas (Morris et al., 1998), onde vários estudos têm revelado a expressão de respostas de defesa contra vários e importantes agentes de doença vegetal, tais como vírus, fungos, bactérias e nematóides, cujos diferentes mecanismos têm sido estimulados por várias substâncias

(Kessmann et al., 1994; Kesmann & Ryals., 1996; Görlach et al., 1996; Pieterse et al., 1998; Sakamoto et al., 1999;). Especificamente relacionado com a cultura do caupi, tem-se verificado a existência de poucos trabalhos. Entre eles vale destacar o de Latunde-Dada & Lucas (2001), onde os autores demonstraram a eficiência da resistência induzida no controle de *Colletotrichum destructivum*.

A resistência induzida pode ser desencadeada pela aplicação de substâncias naturais e/ou sintéticas, além, como já foi afirmado, por microrganismos inativados e/ou por suas partes (Cavalcanti, 2000). Os indutores naturais normalmente são constituídos por moléculas de oligossacarídeos constituintes da parede celular de patógenos como glucanas, derivados de quitina, glicoproteínas e, ainda, polissacarídeos da parede celular vegetal (Hann, 1996). Dentre as substâncias sintéticas, destaca-se o ácido salicílico e seus derivados, como o acibenzolar-S-methyl (ASM) e o ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA), entre os mais estudados. Outras moléculas têm se destacado, também, por sua capacidade de induzir resistência, a exemplo do etefon, uma substância que libera etileno (Ye et al., 1992), ácido jasmônico e ácido β-aminobutírico (Cohen et al., 1994; Cohen, 2002), silício (Menzies et al., 1991; Cherif et al., 1992; Vidhyasekaran, 1997), fosfatos (Gottstein & Kuc, 1989) e diversos sais inorgânicos (Yoshikawa et al., 1993).

2.6.2 Controle genético de *M. phaseolina*

O uso de cultivares resistentes constitui uma das mais importantes medidas a serem incorporadas ao manejo das doenças, visto que, uma vez adquiridas as cultivares resistentes, a utilização das mesmas para o controle de doenças é sempre a medida mais econômica, por não acarretar significativo aumento dos custos de produção e também por ser compatível com outros métodos de controle (Kimati & Bergamin Filho, 1995; Camargo & Bergamin Filho, 1995).

Para muitas espécies cultivadas têm sido identificadas fontes de resistência ao fungo *M. phaseolina*. Zimmer & Hoes (1978) citam que o melhor controle da podridão cinzenta do caule é a utilização de cultivares que possuam genes para resistência a *M. phaseolina*.

Malavolta Júnior et al. (1982), estudando o comportamento varietal de feijão, verificaram que a variedade Chumbinho Opaco apresentou maior grau de resistência ao fungo que as demais variedades avaliadas.

Issa (1985), avaliando o grau de resistência ao agente da podridão cinzenta do caule em cultivares de feijoeiro utilizadas comercialmente no Estado de São Paulo, relatou que a cultivar Moruna 80 apresentou alto nível de resistência.

Echávez-Badel & Beaver (1987) estudaram a resistência e susceptibilidade de 40 genótipos de feijoeiro, sob condições de campo, e verificaram que o genótipo 8437-22 apresentou alta resistência à doença.

Pastor-Corrales & Abawi (1988), estudando a reação de 53 acessos de *Phaseolus vulgaris* a *M. phaseolina*, em condições de casa de vegetação e campo, verificaram existência de cultivares altamente resistentes.

Panizzi (1988), avaliando a reação de cultivares de feijoeiro à *M. phaseolina* através de inoculações artificiais, verificou que o comportamento das plantas variou desde o resistente ao altamente susceptível, citando as cultivares Aeté, Moruna-80 e Negrito como resistentes.

Aires et al. (1994), ao avaliarem a reação de 35 genótipos de feijoeiro a 19 isolados de *M. phaseolina*, destacaram que os genótipos BAT 85, BAT 1293, BAT 1385, entre outros, apresentaram índices baixos de doença, quando avaliados aos 15 dias após a inoculação.

Coelho Neto & Dhingra (1996), através da reação de 30 genótipos de feijoeiro a *M. phaseolina*, verificaram que a podridão cinzenta de pré-emergência foi determinada 12 dias após a semeadura e inoculação, pela contagem de plântulas emergidas. Pelo emprego da técnica de solo-inóculo, identificaram-se as cultivares San Cristobal e EMP-86 como resistentes.

Estudos relacionados à herança da resistência de feijoeiro a *M. phaseolina* indicam que esta é determinada por dois genes complementares dominantes, indicando que a referida resistência tem uma base genética relativamente simples (Olaya & Abawi, 1996), sendo que a transferência destes genes para cultivares comerciais pode ser realizada por meio de métodos tradicionais de melhoramento.

Perez (1998), estudando a especialização patogênica de vários isolados de *M. phaseolina* e avaliando a reação de 40 genótipos de feijoeiro à podridão cinzenta do caule demonstrou que as cultivares Rio Tibagi e Milionário comportaram-se como as mais resistentes ao patógeno, e sugeriu o uso desses genótipos em programas de melhoramento genético.

Maringoni & Lauretti (1999), estudando a reação de feijoeiro a diversos patógenos, inclusive *M. phaseolina* , destacaram o genótipo PI 197687 como o mais resistente, dentre 13 genótipos testados.

Mayek-Perez et al. (2001), trabalhando em condições de campo, identificaram ampla variação na reação de genótipos de feijão comum ao agente da podridão cinzenta do caule. Os autores detectaram genótipos com níveis aceitáveis de resistência, entre os quais destacaram BAT 477, SEQ 12, Negro Tacaná, Negro Perla, entre outros.

Em outros patossistemas também tem sido identificada variabilidade na reação de vários hospedeiros ao patógeno. Dessa forma, Lopes & Kimati (1988a) e Lopes & Kimati (1988b) avaliaram e identificaram fontes de resistência em girassol à podridão negra da raiz, mostrando que o genótipo DK 170 comportou-se como o mais resistente. De & Kaiser (1991), por outro lado, mostraram a existência de genótipos de juta (*Corchorus olitorius*) resistentes e susceptíveis ao patógeno.

Trabalhos relacionados à existência de fontes de resistência em caupi a *M phaseolina*, são escassos. As duas únicas referências encontradas na literaura consultada, são os trabalhos de Rodrigues et al (1997a), em que foram identificados como resistentes os genótipos EPACE 10, L-198.002, L-288.004,

L-190.004 e CNCx-377, em um estudo em que foi avaliada reação de 18 genótipos de caupi ao agente da podridão cinzenta do caule e de Pio-Ribeiro & Assis Filho (1997), que citam o genótipo “Iron” como fonte de resistência ao patógeno.

3 EMPREGO DA RESTRIÇÃO HÍDRICA EM TESTES DE SANIDADE DE SEMENTES DE CAUPI (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

Resumo

Nos testes de sanidade de sementes de caupi, empregando-se o método do papel de filtro, a rápida germinação dificulta a identificação dos fungos, afetando a qualidade da análise. A técnica do congelamento, usada para inibir ou retardar a germinação das sementes e reduzir o comprimento das plântulas, apresenta o inconveniente de exigir a manutenção das sementes em “freezer” por 24 horas, além de induzir o crescimento de bactérias e leveduras saprófitas que reduzem a qualidade da avaliação. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da restrição hídrica como agente de inibição ou de retardamento da germinação das sementes, bem como na detecção de fungos presentes nas sementes e plântulas, em substituição ao método do congelamento. Avaliaram-se também, por meio de raios-X, as possíveis alterações morfológicas verificadas nas sementes submetidas aos tratamentos. Foram comparados os solutos manitol, NaCl e KCl, em soluções com -0,4, -0,6, -0,8 e -0,9 MPa de potencial hídrico, usadas para hidratar o papel de filtro utilizado no teste. A maioria dos solutos e potenciais testados reduziu a germinação das sementes de caupi de 79,3 % (testemunha) e 20 % (com congelamento), para menos de 2,5%, exceto KCl, que apresentou percentagem de germinação de 11,7 %, 13,0 % e 14,4 %, para os potenciais de -0,6, -0,8 e -0,9 MPa, respectivamente. NaCl a -0,6, -0,8 e -0,9 Mpa e manitol inibiram complemente a germinação. A incidência dos fungos foi pouco afetada pelo emprego dos restritores, exceto a

de *Aspergillus* spp., no tratamento com KCl, que teve sua incidência reduzida. Não foram verificadas alterações morfológicas internas nas sementes que permitisse discriminar efeito entre os tratamentos.

Use of hidric restriction in the cowpea seed health test

Summary

In the seed health test of cowpea, being used the blotter test, the fast germination hinders the identification of fungi, affecting the quality of the analysis. The deep freezing method prevents the germination of seeds, but presents the disadvantages of maintenance of seeds in freezer during 24 hours and growth of bacteria and yeasts that reduce the quality of the evaluation. The objective of the present investigation was to study the effect of hidric restriction as agent of inhibition or delay of the seed germination, as well as in the detection of seed-borne fungi instaed of the deep freezing method. The radiological differences hoppened in the seeds submited to the treatments was also evaluated. Were evaluated the solutes sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl) and manitol, incorporated on the water for seed imbibition. This solute were used in the solutions at the –0.4, -0.6, -0,8 and –0.9 MPa of hidric potential. The majority of the solutes and potentials tested reduced the germination of the seeds of cowpea of 79% (H_2O) and 20% (freezing), for less than 3%, except KCl, that presented percentage of germination of 12%, 13% and 14%, for the potentials of –0.6, -0.8 and –0.9 MPa, respectively. NaCl at the –0.6, -0.8 and –0.9 MPa and manitol had inhibited the germination of seeds. The seed-borne fungi incidence was little affected by restrictors, except the one of *Aspergillus* spp. in the KCL treatment that had its incidence reduced. Radiological alterations had not been verified significant the allowed to discriminate effect between the treatments.

3.1 Introdução

O feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma das mais importantes culturas anuais de várias regiões tropicais e sub-tropicais, especialmente em muitos países da África, Brasil e Índia, sendo uma das principais fontes de proteína de boa qualidade e suprimento de energia para as populações mais pobres do mundo (Araújo & Watt, 1988).

Estima-se que o Brasil contribui com 26% da produção mundial e 82% da produção do continente americano (Araújo & Watt, 1988). A área cultivada com caupi no país é de aproximadamente 1 milhão de hectares, dos quais cerca de 900.000 ha (90%) estão situados na Região Nordeste do Brasil (Frota & Pereira, 2000), cuja cadeia produtiva gera, anualmente, 250 milhões de reais e responde por quase um milhão de postos de trabalho (Freire Filho & Ribeiro, 2000). Nessa Região, o rendimento da cultura é baixo e está longe de atingir o seu pleno potencial. Nas condições naturais de cultivo, o caupi é atacado por diversos microrganismos, muitos dos quais eficientemente disseminados pelas sementes, onde provocam baixa germinação e vigor, com reflexos negativos no estande e no rendimento, além de possibilitar o surgimento de plantas doentes em campo (Athayde Sobrinho et al., 2000).

Uma das estratégias que tem sido recomendada na busca por dirimir o impacto das doenças, consiste na análise sanitária das sementes, onde os patógenos, sendo devidamente detectados, podem, em muitos casos, ser facilmente controlados e os problemas decorrentes de sua presença nas sementes resolvidos antecipadamente (Anselme, 1981).

Neergaard (1979) destacou que os testes de sanidade de sementes são sensíveis para, rotineiramente, definir o perfil da microflora das sementes, possibilitando, ainda, o estabelecimento de correlação do referido perfil com as condições de campo em que as sementes foram produzidas.

Para as espécies em que as sementes germinam rapidamente, originando plântulas bem desenvolvidas, têm sido empregados alguns recursos visando inibir o processo. Isso se faz necessário porque o rápido crescimento das plântulas fomenta elevados níveis de contaminações nas placas, reduzindo

a qualidade dos testes (Machado, 1988). Dentre os recursos normalmente empregados, destaca-se o congelamento em “freezer”, usado para análises em plantas poáceas, embora seja também recomendado para algumas leguminosas, e o emprego do 2,4-D, adicionado à água de embebição das sementes, para as leguminosas. Especificamente para o caupi, tem-se empregado o congelamento das sementes.

A técnica do congelamento apresenta os inconvenientes de exigir a permanência das sementes em “freezer” por 24 horas e, normalmente, resulta no crescimento de bactérias e fungos saprófitas que interferem na avaliação (Limonard, 1968). Por outro lado, o emprego do herbicida 2,4-D torna-se problemático por ser, em alguns casos, fungitóxico e requerer cautela no seu uso, pois se trata de um produto tóxico e perigoso à saúde humana e ao meio ambiente.

Considerando-se tais inconvenientes, tem sido indicado, com êxito, para certas espécies, o emprego da restrição hídrica, uma vez que este recurso retarda a germinação, sem afetar o desenvolvimento dos fungos associados às sementes (Carvalho, 1999).

O princípio básico da técnica consiste no uso de baixos potenciais hídricos presentes no líquido usado na embebição das sementes, conseguidos pela adição de solutos que promovem uma redução acentuada dos níveis de absorção de água, bloqueando a seqüência normal de eventos requeridos pela germinação (Bansal et al., 1980). O controle da germinação de sementes para várias espécies cultivadas, empregando solutos iônicos, como o NaCl, KCl e KNO_3, e não iônicos, como manitol e polietileno glicol, tem sido amplamente usado (Guimarães, 1991; Braccini et al., 1996; Camargo, 1998).

Em que pese esse recurso ser empregado com sucesso nos testes de sanidade de sementes de algumas espécies cultivadas (Coutinho, 2000; Coutinho et al., 2001; Alves et al., 2002; Gravena et al., 2002), nenhuma informação voltada para seu uso em testes de sanidades de sementes de caupi, tem sido publicada. Igualmente, não se tem informação sobre se o

congelamento ou a restrição hídrica respondem por danos internos nos tecidos da semente. Nesse particular, Cicero et al. (1998), utilizando a análise de imagens para identificar efeitos de danos mecânicos sobre sementes de milho, observaram que a técnica pode ser empregada para avaliar danos localizados externa e internamente às sementes.

Assim, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito da restrição hídrica na germinação e na incidência de microrganismos nas sementes de caupi, reunindo dados, inclusive de imagens de raios-X, que respaldassem a substituição segura da técnica do congelamento, nos testes de sanidade de sementes de *V. unguiculata*.

3.2 Material e Métodos

Os trabalhos foram conduzidos nos Laboratórios de Patologia de Sementes e de Análise de Imagens da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), em Piracicaba-SP.

Empregaram-se, nos experimentos, sementes de caupi cv. Rouxinol, produzidas no campo experimental da Embrapa Meio-Norte, em Parnaíba, PI, entre os meses de agosto-outubro de 2001.

3.2.1 Avaliação do efeito dos restritores hídricos e do congelamento sobre as sementes e sobre a detecção de fungos

Utilizaram-se como restritores hídricos os solutos manitol, NaCl e KCl, empregados em soluções com -0,4, -0,6, -0,8 e -0,9 MPa de potencial hídrico, as quais foram usadas para hidratar o papel de filtro empregado nos testes. Como controle, empregou-se o método de papel de filtro padrão, com congelamento, conforme metodologia preconizada pela "International Seed Testing Association" (ISTA, 1976), além de uma testemunha, sem congelamento, conforme as Regras de Análise de Sementes (Brasil, 1992) e

Athayde Sobrinho et al. (2002a). Na definição das quantidades de NaCl, KCl e manitol utilizadas na preparação das soluções, foi utilizado o software SPPM (Michel & Radcliffe, 1995), considerando-se a temperatura de 20ºC. As quantidades de solutos utilizados, em grama/litro de água destilada, estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Quantidade de produto utilizado para preparação das soluções de NaCl, KCl e manitol, nos diferentes níveis de potencial osmótico comparados

Potencial osmótico (MPa)	$g.l^{-1}$ de água destilada		
	NaCl	KCl	Manitol
-0,4	5,1	6,6	29,3
-0,6	7,7	9,9	44,9
-0,8	10,3	13,4	59,8
-0,9	11,6	15,1	67,2

Definidos os tratamentos, as sementes foram distribuídas em placas de Petri contendo três folhas de papel de filtro previamente umedecidas em água destilada, para o tratamento com congelamento e testemunha (H_2O), e nas respectivas soluções, para os tratamentos com os restritores hídricos. Foram utilizadas quatro repetições, de 50 sementes cada, por tratamento.

As placas contendo as sementes foram incubadas por um período de sete dias em ambiente controlado, à temperatura de aproximadamente 20 °C, sob regime de 12 horas de luz branca fluorescente/12h escuro, sendo que para o tratamento com congelamento, após as 24 horas iniciais de incubação, as sementes foram submetidas a um período de 24 horas de congelamento, em um freezer a uma temperatura de aproximadamente – 18 ºC.

As variáveis avaliadas foram a percentagem de germinação e a incidência de fungos presentes nas sementes. Para tal, empregou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado, com 14 tratamentos, (três

solutos - NaCl, KCl e manitol), quatro potenciais hídricos (-0,4, -0,6, -0,8 e -0,9 MPa) e duas testemunhas (água e congelamento) com quatro repetições. Para efeito de análise estatística, os dados relativos à percentagem de germinação e de ocorrência dos microrganismos nas sementes foram transformados em arcsen $(x/100)^{1/2}$, sendo as médias comparadas por meio do teste de Tukey a 1% e 5% de probabilidade, conforme Pimentel Gomes (1985). A referida análise foi realizada com o auxílio do procedimento PROC ANAVA do SAS (SAS Institute Inc. 1992).

Após o período de incubação, procederam-se a contagem das sementes germinadas, bem como a identificação e quantificação dos microrganismos. Para tal, empregou-se microscópio estereoscópico, tomando por base o hábito de crescimento dos fungos e, quando necessário, fazendo-se a confirmação em microscópio ótico, com o auxílio de lieratura (Barnet & Hunter, 1972). Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram sinais visíveis de emissão de radícula.

3.2.2 Avaliação, por imagem de raios-X, do efeito dos restritores e do congelamento sobre as sementes

Este experimento objetivou detectar possíveis alterações morfológicas internas provocadas às sementes pelos métodos de restrição hídrica e congelamento e validar a substituição segura da metodologia padrão: papel de filtro com congelamento. Para isso, empregaram-se 48 sementes de caupi cv. Rouxinol (16 sementes/tratamento) e, como restritor hídrico, solução de NaCl a –0,8 MPa de potencial hídrico, selecionada a partir de experimentos conduzidos por Athayde Sobrinho et al. (2002b). Os tratamentos consistiram de congelamento, restrição hídrica a - 0,8 MPa e testemunha, conforme metodologia descrita no item anterior.

As sementes foram colocadas em um recipiente plástico transparente, apropriado para execução das análises, sendo criteriosamente, numeradas de

conformidade à posição ocupada no referido recipiente. Este, contendo as sementes fixadas, foi colocado diretamente sobre um filme de raios-X (Kodak MIN-R 2000, tamanho 18x24 cm), a uma distância de 35 cm da fonte emissora de raios-X.

As imagens de raios-X foram obtidas em aparelho marca Faxitron X-ray, modelo MX-20, usando-se uma intensidade de radiação de 25 Kv e um tempo de exposição de 40 segundos. Após terem sido reveladas, as imagens foram capturadas por "scaner", marca Umax, modelo PowerLook 1100, posteriormente ampliadas e analisadas individualmente (Athayde Sobrinho et al., 2002), com vistas à detecção de impressões radiográficas que caracterizassem alterações internas provocadas pelos aludidos métodos. As imagens foram geradas antes e depois de serem estabelecidos os tratamentos. Na avaliação e análise das imagens foram considerados padrões de radiodensidade presentes nas sementes, confrontando-se observações qualitativas percebidas antes e depois da aplicação dos tratamentos.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1. Efeito na germinação

Todos os solutos e potenciais avaliados reduziram significativamente ($P<0,05$) a germinação das sementes de caupi. O tratamento menos eficiente foi o que teve como soluto o KCl, no potencial de -0,6 MPa, apresentando uma taxa de germinação de 14 %, o qual, embora tenha se mostrado semelhante ao KCl –0,8 MPa (13%), ao congelamento (12 %) e KCL a-0,4 MPa (12 %), revelou-se significativamente diferente dos demais tratamentos (Tabela 2).

Nos tratamentos em que foram usadas soluções osmóticas de NaCl a -0,8 e –0,9 MPa, assim como manitol a –0,8 MPa, não foi observada a germinação de nenhuma semente, tendo esses valores sido diferentes daqueles observados para congelamento (11,76 %), que é o procedimento

padrão utilizado para inibir ou retardar a germinação de sementes da espécie nos testes de sanidade. Esses resultados estão, de uma maneira geral, de acordo com os de Coutinho et al. (2001), em que utilizaram o teste de ágar em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*). Os autores, estudando o efeito dos mesmos restritores nos potencias osmóticos de -0,6 e –0,7 MPa, destacaram que, excetuando NaCl a –0,6 MPa, todos os demais tratamentos inibiram significativamente a germinação das sementes, quando comparado à testemunha (ágar sem restritor).

A inibição e/ou o atraso na germinação das sementes, observado com o emprego dos restritores, pode ser explicado pela ocorrência de estresse hídrico a que são submetidas as sementes quando condicionadas aos referidos potenciais osmóticos. Nessa situação, a adição de solutos promove uma redução acentuada dos níveis de absorção de água, bloqueando a seqüência normal de eventos requeridos pela germinação (Bansal et al., 1980), como resultado de uma menor disponibilidade de água para a digestão das reservas e translocação das substâncias metabolizadas. Para Wenkert et al. (1978) o fenômeno ocorre devido a uma interferência no processo de elongamento celular, o qual é externado pela ausência de emissão da radícula. Outros trabalhos, entretanto, destacam que a referida inibição ocorre em função do efeito tóxico de alguns solutos sobre os tecidos embrionários das sementes. O NaCl e o manitol, por exemplo, são referidos por Van Der Moezel & Bell (1987) como solutos que interferem na germinação, tanto pelo seu efeito osmótico quanto pelo seu efeito tóxico sobre as células seminais.

Um aspecto merecedor de nota é o fato de terem sido verificadas diferenças de respostas entre os solutos testados, quando estes apresentam o mesmo potencial osmótico (Tabela 2). Isto pode estar relacionado, além das diferenças de toxidez desses solutos, às diferenças de potencial hídrico de equilíbrio, específico entre a semente e o meio externo, que, conforme Heydecker et al. (1975) e Bradford (1986), podem variar significativamente em

função das características da espécie, da cultivar e até mesmo entre os lotes de sementes.

O congelamento mostrou-se, no presente trabalho, pouco eficiente, embora tenha se mostrado significativamente diferente da testemunha (H_2O), a qual apresentou uma percentagem de germinação de 12 % (Tabela 2). Esse índice pode comprometer a qualidade do teste devido ao crescimento da radícula, seu contato com as sementes adjacentes e ulterior contaminação, com reflexos negativos sobre os testes (Machado, 1988). O fenômeno pode ser explicado pelo alto vigor das sementes que garantiu o rápido início e a manutenção do processo germinativo, mesmo sob baixa temperatura a que as sementes foram submetidas no “freezer”.

3.3.2 Efeito na incidência de microrganismos

Os dados relativos à incidência dos microrganismos detectados nas sementes estão apresentados nas Tabelas 2 e 3. Os fungos mais freqüentemente identificados foram: *Aspergillus* spp., *Cladosporium* sp., *Penicillium* spp., *Fusarium oxysporum* e *Fusarium semitectum*. De maneira geral, a detecção dos fungos foi pouco afetada pelo emprego dos restritores, exceto *Aspergillus* spp. no tratamento com KCl, especialmente no potencial de –0,9 MPa, cuja incidência mostrou-se significativamente inferior à testemunha congelamento (Tabela 2). Por outro lado, os resultados relativos a *Penicillium* spp., apesar de, para todos os tratamentos alternativos, não terem sido verificadas diferenças significativas em relação à metodologia padrão, diferenças significativas foram obtidas entre KCl a -0,8 MPa (45,9%) e a testemunha (20,84 %) e, ainda, entre KCl a -0,8 MPa e NaCl a -0,9, -06,e -0,4 MPa, com valores de 19,5%, 19,1% e 12,3 %, respectivamente, os quais não diferiram entre si (Tabela 2). Os valores relativos à incidência de *Aspergillus* e *Penicillium* spp. são compatíveis com os encontrados por Sallis et al. (2001), cujas incidências máximas e mínimas para cada um dos fungos foram 4,5-

50,5% e 2,25-63%, respectivamente. Concordam também com os dados de Oliveira (1981) e Athayde Sobrinho et al. (1998), no que tange ao nível de incidência dos mesmos às sementes. Coutinho (2000), trabalhando com restrição hídrica em teste de sanidade de sementes de feijão, concluiu que os restritores NaCl, KCl e manitol, nos potenciais osmóticos situados entre –0,4 e –0,9MPa, não afetaram significativamente a detecção da micoflora presente nas sementes, contudo, foi observado um efeito marcante desses restritores sobre o crescimento dos fungos em meio de cultura.

Tabela 2. Valores médios de germinação (%) e incidência (%) de fungos de armazenamento em sementes de caupi cv. Rouxinol, submetidas ao teste de sanidade de sementes pelo método de incubação em papel de filtro com e sem congelamento usando diferentes restritores hídricos

Tratamento	Germinação (%)**	Incidência (%)	
		Aspergillus spp.	*Penicillium* spp.
Água (testemunha)	83,0[a]*	38,9 ab*	20,8 bc
Congelamento	12,0bcd	28,4 abc	25,7 abc
KCl (-0,4 MPa)	12,0 bcd	7,4 cd	40,2 ab
KCl (-0,6 MPa)	14,0 b	12,9 cd	28,2 abc
KCL (-0,8 MPa)	13,0 bc	7,0 cd	45,4 a
KCL (-0,9 MPa)	1,0 e	2,0 d	33,9 abc
Manitol (-0,4 MPa)	2,4 cde	14,3 bcd	22,7 abc
Manitol (-0,6 MPa)	2,1 cde	14,5 abcd	30,1 abc
Manitol (-0,8 Mpa)	0,0 e	8,7 cd	36,8 ab
Manitol (-0,9 MPa)	1,1 e	28,3 abc	23,9 abc
NaCl (-0,4 MPa)	1,7 de	25,2 abc	12,3 c
NaCl (-0,6 MPa)	0,5 e	40,0 a	19,1 bc
NaCl (-0,8 MPa)	0,0 e	23,9 abc	35,1 ab
NaCl (-0,9 MPa)	0,0 e	28,2 abc	19,5 bc

*Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).
** Considerou-se germinada a semente que apresentou sinal visível de emissão da radícula

Analisando-se os dados relativos à detecção de *Cladosporium* sp., *F. oxysporum* e *F. semitectum* observa-se, pela Tabela 3, que houve pouca influência dos restritores na detecção dos mesmos, sobretudo para *Cladosporium* sp., em que não se verificou diferença significativa (P<0,05) entre os tratamentos. Entretanto, observou-se uma tendência a maior sensibilidade

do congelamento para detecção de *F. oxysporum*, quando comparado com KCl (-0,4, -0,6 e –0,8 MPa), manitol (-0,9 Mpa) e NaCl (-0,4 e –0,8MPa), bem como para *F. semitectum*, onde a técnica mostrou-se mais sensível que KCl a -0,4 e -0,6 Mpa, e manitol a -0,9 MPa. Esses dados parecem refletir uma tendência geral do congelamento em promover uma boa expressão de fungos do gênero *Fusarium* (Menten[3]). Esse comportamento pode, no âmbito desse trabalho, ser explicado pela pouca interferência do crescimento abundante de levedura (Tabela 3), sobre os referidos fungos. Provavelmente, a interação entre levedura e os fungos do gênero *Fusarium* seja simbiótica do tipo neutra (Ponte, 1980; Bergamin Filho, 1995), na qual os organismos apresentam íntimo contato físico sem que nenhuma das partes tenha seu desenvolvimento afetado pela presença da outra, diferentemente da interação entre a levedura com os demais fungos detectados.

[3] MENTEN, J.O.M. Comunicação pessoal, 2001.

Tabela 3. Incidência (%) de fungos de campo e de levedura em sementes de caupi cv. Rouxinol, submetidas ao teste de sanidade de sementes pelo método de incubação em papel de filtro com e sem congelamento e usando diferentes restritores hídricos

Tratamento	Incidência (%)			
	F. oxysporum	*F. semitectum*	*Cladosporium* sp	Levedura
Água (testemunha)	0,5 ab*	0,9 ab	24,3 n.s.	1,0 c
Congelamento	3,7 a	2,6 a	15,7	59,6 a
KCl (-0,4 MPa)	0,0 b	0,0 b	20,1	0,0 c
KCl (-0,6 MPa)	0,0 b	0,0 b	24,8	0,5 c
KCL (-0,8 MPa)	0,1 ab	0,3 ab	19,9	0,0 c
KCL (-0,9 MPa)	0,0 b	0,3 ab	25,2	0,5 c
Manitol (-0,4 Mpa)	2,0 ab	1,2 ab	25,5	1,2 c
Manitol (-0,6 Mpa)	1,1 ab	0,9 ab	18.9	0,5 c
Manitol (-0,8 Mpa)	0,5 ab	0,7 ab	24,2	0,0 c
Manitol (-0,9 Mpa)	0,0 b	0,0 b	16,5	0,0 c
NaCl (-0,4 MPa)	0,0 b	0,1 ab	19,4	0,0 c
NaCl (-0,6 MPa)	0,1 ab	0,6 ab	23,5	2,0 bc
NaCl (-0,8 MPa)	0,0 b	0,2 ab	22,3	1,0 c
NaCl (-0,9 MPa)	0,1 ab	0,5 ab	18,2	9,8 b

*Médias seguidas de mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

A utilização dos restritores nos potenciais avaliados, não afetou qualitativamente o aspecto visual das sementes. Todavia, o mesmo não pode ser afirmado em relação ao congelamento, onde as mesmas, após o período de incubação, mostraram-se com tegumento coriáceo, predominantemente escuro e revelando uma quantidade elevada de colônias de levedura (59,3%) (Tabela 3 e Figura 1) e bactérias saprófitas. Tais alterações podem ser resultantes do brusco rompimento da parede celular dos tecidos das sementes

pelos cristais, resultado do processo de solidificação da água contida no interior das células, levado a efeito pela baixa temperatura do “freezer” (-18º C). Com a formação dos cristais e a conseqüente ruptura das paredes, ocorre a exsudação de líquidos do interior das sementes, que servem de substrato ao desenvolvimento de microrganismos saprófitas (Coutinho, 2000).

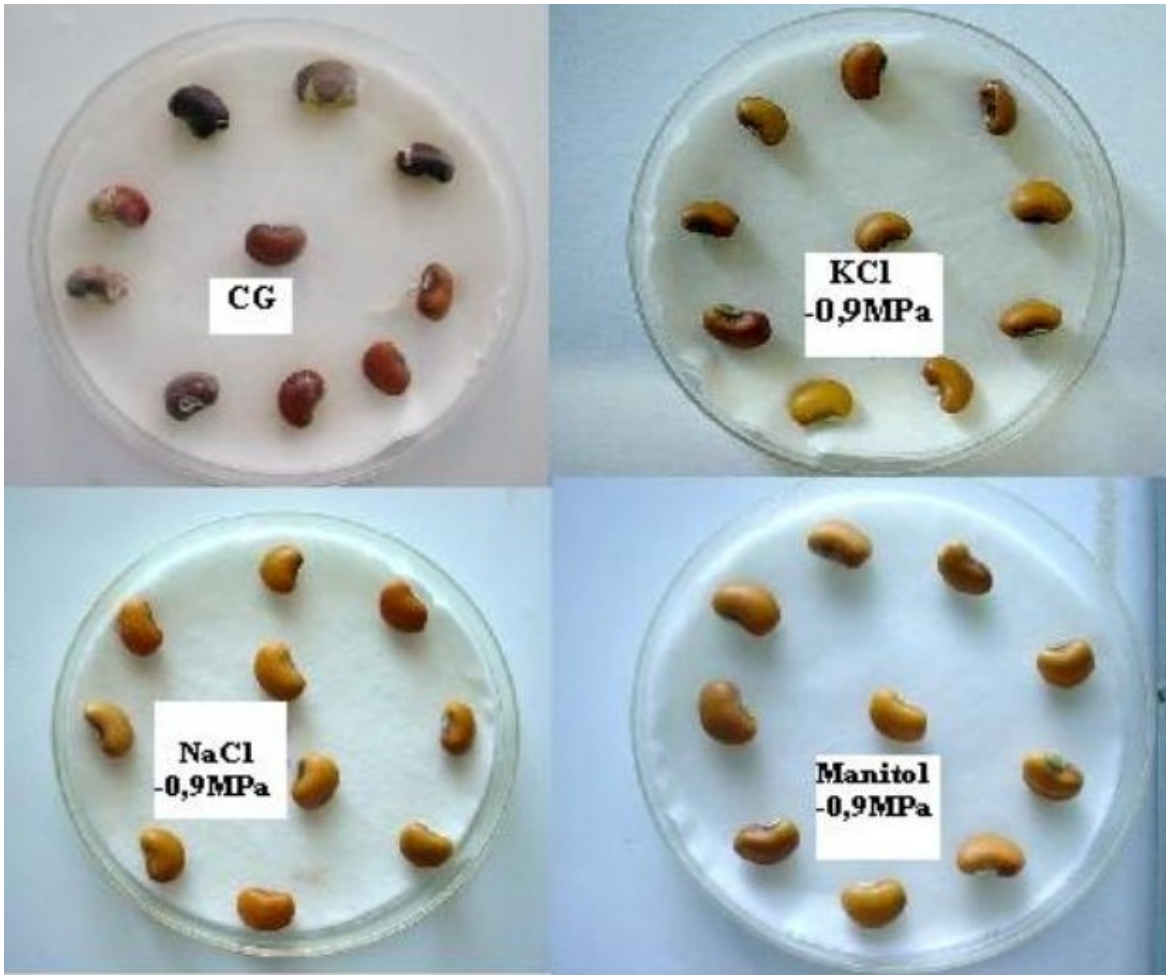

Figura 1 - Aspecto das sementes de caupi submetidas aos tratamentos visando inibir a germinação (Congelamento – CG; Cloreto de potássio – KCl; Manitol – M e Cloreto de sódio – NaCl)

Dessa forma, a restrição hídrica, levada a efeito pelo uso de soluções de NaCl, KCl e manitol ao substrato, pode ser considerada uma alternativa interessante ao congelamento nos testes realizados pelo método de incubação em papel de filtro, em que existe a necessidade de inibir ou retardar o processo germinativo das sementes. Nesse sentido, os trabalhos de Coutinho (2000) e Coutinho et al. (2001) recomendam emprego dos referidos restritores em soluções usadas nos substratos de incubação dos testes de sanidade de sementes de feijão e arroz.

A técnica da restrição hídrica, além de apresentar maior praticidade quando comparada com o congelamento, pois requer menos mão de obra, apresenta, ainda, a vantagem de não matar as sementes e, estas se mantendo vivas, possibilitam a expressão de resultados, em termos de detecção, mais próximos das condições naturais. O NaCl, usado como restritor hídrico, apresenta ainda a vantagem de ser atóxico e de fácil obtenção.

3.3.3 Alterações morfológicas internas nas sementes

Os resultados relativos à análise de raios-X estão apresentados nas Figuras 2, 3 e 4. Nelas foram mapeadas áreas que estão destacadas entre linhas pontilhadas e que permitiram a avaliação qualitativa do efeito dos tratamentos.

A Figura 2A mostra aspectos da semente de caupi antes da aplicação do congelamento. Na imagem podem ser visualizadas áreas em branco que representam regiões rádio-densas (rd), isto é, áreas estruturalmente firmes, constituídas de tecidos mais endurecidos que apresentam maior capacidade de reflexão dos raios-X. Em contraposição, podem, também, ser visualizadas áreas menos radio-densas, de tecidos mais hidratados, permeáveis, caracterizadas como áreas moles (am). Essas, vias de regra, são coincidentes com a região do eixo embrionário das sementes. Confrontando-se essa imagem com a da Figura 2B (após o congelamento), observa-se uma

proporcional expansão dessas regiões, cujo padrão é perfeitamente compatível com o aumento de volume da semente proporcionado pela hidratação. Isto indica que o processo de congelamento não interferiu com o padrão radiográfico e que, internamente, as estruturas da semente foram preservadas. Idênticas observações são válidas para o tratamento com o restritor NaCl a –0,8 MPa, (Figura 3), bem como para testemunha (Figura 4).

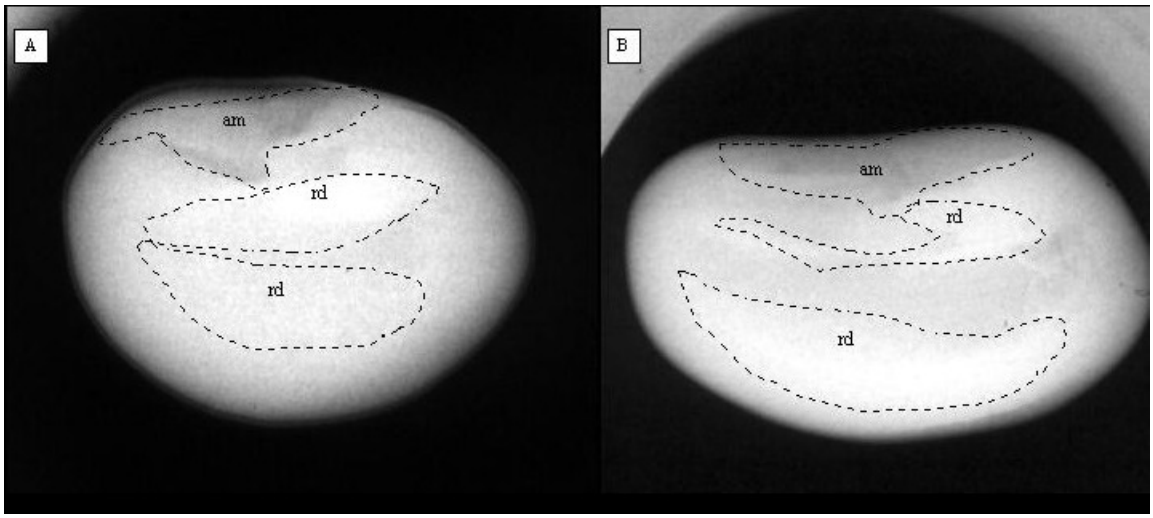

Figura 2 - Imagens de raios-X de sementes de caupi: congelamento: antes do congelamento (A) e após serem submetidas ao congelamento (B); áreas rádio-densas (rd); áreas moles (am)

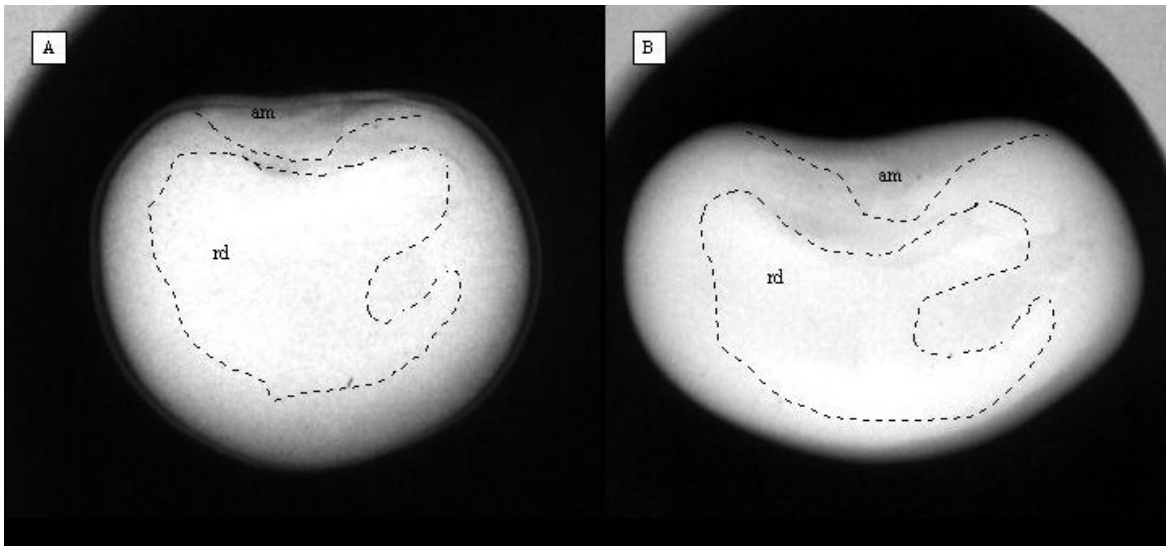

Figura 3 - Imagens de raios-X de sementes de caupi: antes da restrição hídrica (A) e após serem submetidas a restrição hídrica (B); áreas rádio densas (rd); áreas moles (am)

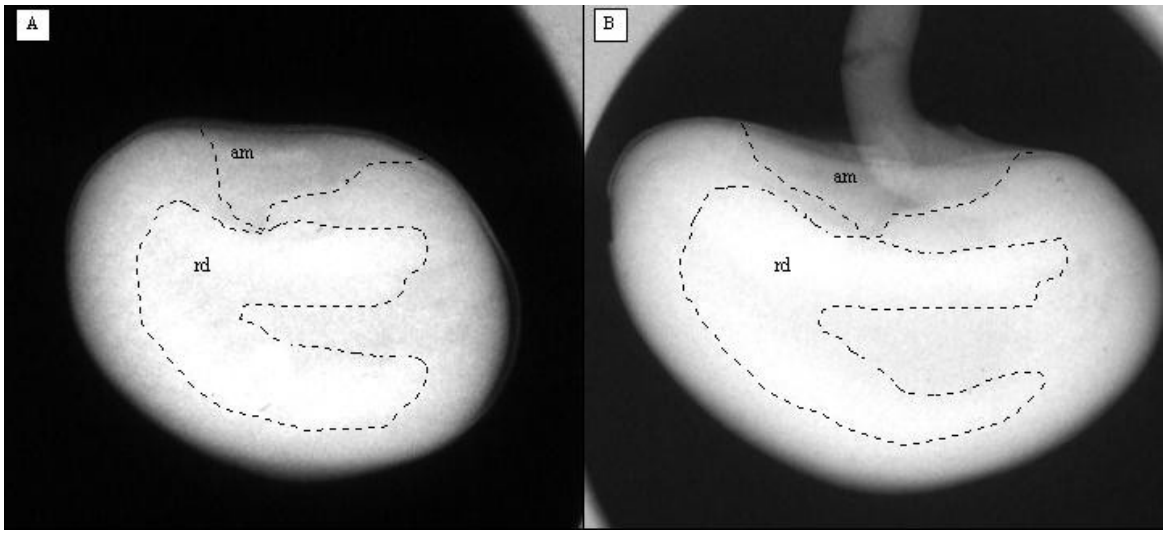

Figura 4 - Imagens de raios-X de sementes de caupi: antes da embebição com água (A); após início germinação (B); áreas rádio-densas (rd); áreas moles (am)

Na Figura 4B pode ser observada, ainda, a imagem de parte da raiz primária, a qual se mostra totalmente preservada, bem como toda a região visível do eixo embrionário.

Pelas imagens de raios-X ficou demonstrado ausência de alterações morfológicas capazes de distinguir efeitos significativos entre os tratamentos, indicando assim, que não existem limitações que inviabilizem a adoção do método de restrição hídrica, como forma de inibir ou retardar a germinação das sementes de caupi, nos testes de sanidade (Athayde Sobrinho et al., 2002b).

3.4 Conclusões

1. A restrição hídrica induzida por NaCl, KCl e manitol, nos potenciais osmóticos avaliados, inibiu a germinação das sementes de caupi submetidas à análise sanitária pelo método de incubação em papel de filtro.

2. A restrição hídrica induzida por NaCl, KCl e manitol, nos diferentes potenciais osmóticos comparados, interferiu na detecção dos microrganismos associados às sementes.

3. A restrição hídrica induzida pelos solutos, nos diferentes potenciais osmóticos testados, não foi capaz de promover alterações morfológicas que pudessem discriminar efeitos diferenciais entre os tratamentos.

4. O método do congelamento, para inibir ou retardar a germinação de sementes de caupi, pode ser substituído pela restrição hídrica, especialmente por aquela induzida por NaCl a –0,8 ou –0,9 MPa, por se tratar de um sal barato, atóxico e facilmente disponível na natureza.

4 EFEITO DA RESTRIÇÃO HÍDRICA NA DETECÇÃO DE *MACROPHOMINA PHASEOLINA* EM SEMENTES DE CAUPI

Resumo

A técnica do congelamento usada para inibir ou retardar a germinação das sementes e garantir a qualidade e confiabilidade dos testes de sanidade de sementes, apresenta alguns inconvenientes. Entre eles destaca-se o crescimento de bactérias e leveduras saprófitas sobre as sementes, o que reduz a qualidade da avaliação. O método da restrição hídrica tem substituído com eficiência o congelamento, permitindo a detecção de vários fungos importantes associados às sementes de várias espécies. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito desse método sobre a detecção de *Macrophomina phaseolina* em sementes de caupi. Foram usadas amostras de sementes de três cultivares, naturalmente infectadas e apresentando três níveis de incidência de *M. phaseolina*: baixo (3%), médio (19%) e alto (33%). O experimento foi estruturado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo comparados três tratamentos: restrição hídrica (NaCl – 0,8 Mpa), congelamento e sem congelamento (H_20). Em todos os tratamentos utilizou-se o método de papel de filtro padrão (ISTA, 1976). As variáveis avaliadas foram percentagem de germinação e incidência de *M. phaseolina* nas sementes. Os resultados mostraram que a restrição hídrica, além de inibir a germinação das sementes, mostrou-se mais sensível que o congelamento para

níveis médios e altos do patógeno nas sementes. Em níveis baixos de incidência, entretanto, o método foi semelhante ao congelamento.

The effect of hydric restriction in the detection of the *macrophomina phaseolina* in the cowpea seeds.

Summary

The freezing technique used to inhibit or delay the seeds germination and to ensure the quality and trustfulness of the seeds sanity tests, presents some inconvenient. Among them, it stands out the bacteria growing and saprophytes yeasts on the seeds, which reduce the quality of evaluation. The method of hydric restriction has efficiently replaced the freezing, allowing the detection of several important fungus associated to several species of seeds. This work had as a scope to evaluate the effect of such method on the detection of the *Macrophomina phaseolina* in cowpea seeds. Samples of three cultivars seeds naturally infected were used also presenting three levels of incidence of *M. phaseolina*: low (3%), medium (19%) and high (33%). The trial was structured in a delineation completely fortuitous with four repetitions and was compared to three treatments: hydric restriction (NaCl – 0,8 Mpa), with and without freezing (H_20). In all treatments it was used the standard method of filter paper. The evaluated variables were the percent of germination and the incidence of *M. phaseolina* in the seeds. The results have shown that the hydric restriction, apart from inhibiting the germination of the seeds, has shown itself more sensitive than the freezing for medium and high levels of pathogen in the seeds. In low levels of incidence, however, the method was similar to the freezing.

4.1 Introdução

As sementes constituem-se, para muitos dos fitopatógenos conhecidos, em meio quase que exclusivo de sobrevivência e, dessa forma, elas desempenham papel fundamental no transporte e introdução de novos patógenos em áreas livres (Anselme, 1981; Menten & Bueno, 1997), seleção de raças patogênicas em regiões em que o patógeno já esteja estabelecido (Machado 1987), além da manutenção temporal da viabilidade do patógeno.

O conhecimento e a manutenção do padrão sanitário das sementes constitui-se, portanto, em um dos mais importantes requisitos para o estabelecimento de uma agricultura rentável e sustentável. Vários têm sido os casos em que o uso de sementes infectadas/contaminadas resultou na introdução de patógenos em áreas indenes (Neergaard, 1979; Machado, 1987). Diante dessa realidade, tem crescido a importância da Patologia de Sementes, como uma ciência capaz de auxilar na redução dos riscos e, conseqüentemente, dos danos resultantes da ação de fitopatógenos à agricultura.

Neste contexto, uma das mais importantes ferramentas disponibilizadas pela Patologia de Sementes foi o desenvolvimento de metodologia para a detecção e controle dos patógenos associados às sementes (Machado, 1987). De acordo com Lucca Filho (1987), vários métodos podem ser empregados para caracterizar o estado sanitário de um lote de sementes, sendo que a escolha do mais apropriado está na dependência do patógeno, da infra-estrutura laboratorial disponível, da espécie da semente a ser avaliada, da finalidade do teste, além do grau de treinamento do pessoal envolvido com a análise.

Trabalhos relacionados à detecção de fungos em sementes, destacando diferentes metodologias, têm sido publicados, com freqüência, nas últimas décadas (Neergaard, 1979; Lee & Chung 1995; Lagerberg et al., 1996; Wu & Chen, 1999).

Especificamente relacionados à cultura do caupi, os trabalhos não são muitos; entretanto, nos poucos disponíveis, tem-se observado uma ampla desuniformidade de metodologias adotadas (Araújo, 1985; Choudhrury, 1987). Isso pode ser verificado em trabalhos como os de Bolkan et al. (1978), Batista (1981) e Batista (1982) em que os autores empregaram meio BDA, com pré-tratamento das sementes. Choudhury (1982) não empregou pré-tratamento, mas usou luz negra, alternada com escuro total, temperatura 25-28°C, em um período de incubação de sete dias. Oliveira (1981) e Oliveira & Bolkan (1981) empregaram meio BDA + estreptomicina e BDA + fungicida. Oliveira & Bolkan (1982) fizeram pré-tratamento e utilizaram um período de incubação de cinco dias. Barros & Menezes (1981) empregaram o método do ágar, conjugado em diferentes condições de luminosidade, pré-tratamento de sementes e período de incubação de 8 dias. Araújo et al. (1983) empregaram papel de filtro, esterilização superficial das sementes, luz natural, temperatura de 22 $\pm$ 2 °C e período de incubação de oito dias. As Regras para Análise de Sementes, recomendam, para essa espécie, simplesmente o teste do papel de filtro, incubação por sete dias, a temperatura de 20 ± 2^0C e 12 horas luz/12 horas escuro (Brasil, 1992). Esta variação entre as metodologias empregadas, certamente, é causa de desuniformidade das informações atinentes ao real estado sanitário das sementes de caupi.

Um outro problema é que, para muitas cultivares, a utilização exclusiva do método do papel de filtro, sem nenhum recurso associado que venha inibir ou retardar a germinação das sementes, tem se mostrado pouco eficiente, devido a rápida germinação das sementes e a um crescimento vigoroso das plântulas. Tal fenômeno é verificado para muitas outras espécies cultivadas (Machado, 1988). Visando solucionar esse problema, tem sido utilizado o congelamento das sementes e/ou a aplicação do herbicida 2,4-D na água utilizada na embebição do papel de filtro usado nos testes. No primeiro caso, há o inconveniente de um maior manuseio das sementes, associado ao fato de o congelamento favorecer o crescimento de organismos saprófitas que

reduzem a qualidade da avaliação (Limonard, 1968). No segundo, o uso do herbicida apresenta a limitação da sua toxicidade inerente, com o agravante de risco para o homem e para o meio ambiente.

Para contornar tais inconvenientes, tem sido avaliada, com sucesso, a técnica da restrição hídrica, uma vez que este recurso também inibe a germinação, sem afetar o desenvolvimento dos fungos associados às sementes (Carvalho, 1999; Oliveira et al., 2001). Esta metodologia consiste na aplicação de solutos iônicos e não iônicos na água de embebição das sementes, visando inibir a germinação (Bansal et al., 1980). Esse método vem sendo usado, com sucesso, na detecção de fungos em várias outras espécies cultivadas (Coutinho et al., 2001, Alves et al., 2002; Gravena et al., 2002), inclusive no caupi, onde a técnica mostrou-se interessante na detecção de importantes patógenos (Athayde Sobrinho et al., 2002a; Athayde Sobrinho et al., 2002b). Todavia, não se conhece o efeito desse tratamento na deteção de *M. phaseolina*, um importante patógeno da cultura, eficientemente transmitido pela semente (Barros & Menezes, 1981; Choudhury, 1987).

Assim, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito da restrição hídrica na detecção do fungo *M. phaseolina* em sementes de caupi, naturalmente infectadas.

4.2 Material e Métodos

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Sementes da ESALQ/USP, em Piracicaba-SP.

Empregaram-se nos experimentos, amostras de sementes de caupi pertencentes a três cultivares, naturalmente infectadas e apresentando três níveis diferentes de incidência de *M. phaseolina,* sendo nível baixo (3%), nível médio (19%) e alto (33%), presentes nas cultivares Branquinho, Tracuateua e Monteiro, respectivamente.

O experimento, utilizando o método de papel de filtro padrão (ISTA, 1976), foi estruturado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo comparados três tratamentos: restritor hídrico (NaCl – 0,8 Mpa), congelamento e uma testemunha (H_20). Na definição das quantidades de NaCl, utilizou-se o software SPPM (Michel & Radcliffe, 1995), considerando-se a temperatura de 20ºC.

As sementes pertencentes aos tratamentos restrição e testemunha foram incubadas durante sete dias, em ambiente controlado, à temperatura de 20 ± 2 ^{o}C e regime luminoso de 12 horas de luz branca fluorescente/12 horas de escuro. Igual condição foi dada para o tratamento com congelamento, exceto que, após as primeiras 24 horas de incubação, as sementes foram congeladas em "freezer" (-18°C) por igual período, retornando, em seguida, à condição original e aí permanecendo por mais cinco dias.

As variáveis avaliadas foram: percentagem de germinação e incidência de *M. phaseolina* nas sementes, cuja avaliação foi feita através de microscópio estereoscópico, sendo considerado na identificação, o hábito de crescimento do fungo. Para efeito de análise, foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram sinais visíveis de emissão de radícula.

Os dados relativos as variáveis foram transformados em $\sqrt{X+0,5}$, sendo os resultados confrontados por meio do teste de comparação múltipla de médias (Tukey) a 5% e 1% de probabilidade, conforme Pimentel Gomes (1985). A referida análise foi realizada com o auxílio do procedimento PROC ANAVA do SAS (SAS Institute Inc. 1992).

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Efeito na germinação

Os dados apresentados na Figura 5 mostram que os tratamentos usados para inibir a germinação (restrição hídrica e congelamento) foram efetivos em todas as cultivares avaliadas, não sendo observada nenhuma semente germinada em ambos tratamentos, os quais diferiram significativamente da testemunha. Estes resultados confirmam os valores encontrados no Capítulo 3, para a cultivar Rouxinol, em que pese a observação de que o congelamento pode falhar no caso de as sementes apresentarem alto vigor.

Os mecanismos pelos quais a germinação é inibida pela restrição hídrica estão relacionados, fundamentalmente, a dois efeitos distintos que podem ser complementares (Capítulo 3). O primeiro, diz respeito à redução nos níveis de absorção de água pelas sementes, induzido pelos elevados potenciais osmóticos provocados pelos solutos (Bansal et al., 1980), e o segundo, devido a um efeito tóxico do agente restritor sobre as células embrionárias das sementes (Van Der Moezel & Bell, 1987). Relativamente ao congelamento, a ausência de germinação pode ser explicada pelo aumento de volume motivado pelo processo de solidificação da água, associado à formação de cristais de água no conteúdo celular, do que resulta em um brusco rompimento das células do embrião, levando à morte dos tecidos e, conseqüentemente, ao bloqueio da germinação.

Comparando-se os dados de percentagem de germinação, observa-se que, de uma maneira geral, os valores foram baixos, sendo que o maior índice foi apresentado pela cultivar Branquinho (45%), cujo valor foi significativamente ($P \leq 0,01$) superior aos obtidos pelas cultivares Monteiro (25%) e Tracuateua (16%), as quais não diferiram significativamente entre si (Figura 5). Vale destacar que esses valores, embora baixos, foram obtidos nas condições 20 ±

2ºC de temperatura e fotofase de 12h luz/12h escuro, condição diferente das usadas nos testes de germinação, em que as condições são ideais à ocorrência do processo (Brasil, 1992).

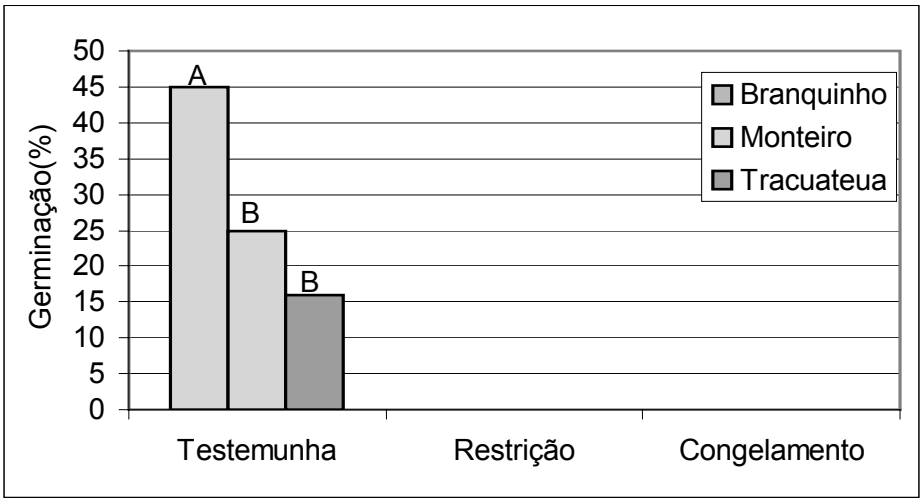

Figura 5 - Efeito do congelamento e da restrição hídrica sobre a germinação de sementes de três cultivares de caupi (médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (P≤0,01) pelo teste de Tukey)

Dessa forma, considerando-se os valores de percentagem de germinação, verifica-se que os mesmos atendem um dos requisitos básicos que justificam o emprego da restrição hídrica e, portanto, o método pode ser empregado, com êxito, como uma alternativa ao congelamento visando inibir o processo germinativo das sementes.

4.3.2 Efeito na incidência de *M. phaseolina*

Os dados da Tabela 4 demonstram diferenças significativas quanto à incidência de *M. phaseolina* nos diferentes restritores e níveis originais de incidência (P≤0,01), bem como na interação desses fatores (P≤0,05). Na Figura 6, verifica-se que a incidência de *M. phaseolina*, dentro de cada nível avaliado, apresentou diferença significativa entre a condição congelamento e restrição hídrica, a qual mostrou-se semelhante à testemunha. Exceção feita para o nível baixo de incidência, no qual a detecção do patógeno não foi afetada pelos tratamentos empregados. A análise desses dados permite inferir que, para níveis baixos de incidência do patógeno na amostra, os valores de incidência detectados são pouco afetados pelos tratamentos, indicando que, neste caso, pode ser empregado tanto o congelamento quanto a restrição hídrica. Entretanto, quando se tratar de amostras com índices de médio a alto do patógeno nas sementes, o método do congelamento torna-se inadequado, uma vez que ele tende a subestimar esse parâmetro.

Comparando-se os valores de incidência, detectados através do método da restrição hídrica, com aqueles apresentados pela amostra original (Item 4.2), verifica-se que os mesmos são bastante semelhantes. Isto demonstra a reproducibilidade do método e aumenta sua confiabilidade, reforçando a argumentação de o mesmo vir a ser uma alternativa viável (Capítulo 3). Essa observação é apoiada pelas informações de Coutinho (2000), quando o autor destaca que a restrição hídrica usando NaCl, com potencial osmótico variando de –0,4 a –0,9MPa, não afeta significativamente os níveis de detecção de fungos em sementes de feijão.

Tabela 4. Resumo da análise de variância da incidência (%) de *M. phaseolina* em sementes de caupi, apresentando três níveis de incidência do patógeno e submetidas a dois inibidores de germinação e a testemunha

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Restritor	2	1149,5	574,7	16,33**
Nível	2	3538,8	1769,4	50,28**
Restritor vs nível	4	496,9	124,2	3,53*
Resíduo	27	950,2	35,1	
Total	35			

** significativo a 1% de probabilidade * signficativo a 5% de probabilidade

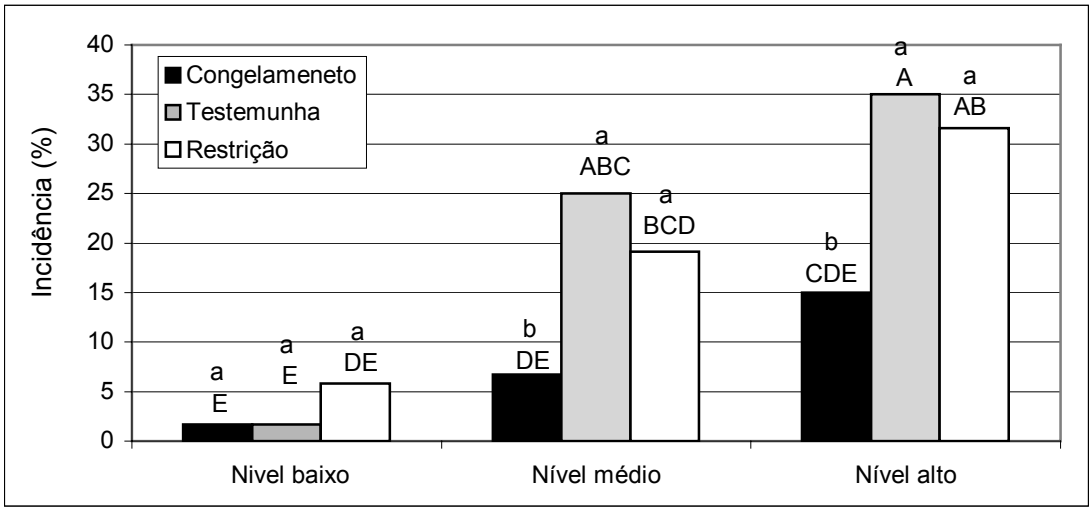

Figura 6 - Efeito do congelamento e da restrição hídrica sobre a incidência de *M. phaseolina* em amostras de sementes de três cultivares de caupi, naturalmente infectadas e apresentando níveis diferentes de incidência do patógeno (Médias seguidas de mesma letra minúscula dentro de nível e maiúscula entre níveis, não diferem entre si (P≤0,05) pelo teste de Tukey

Conforme discutido no Capítulo 3, o método do congelamento favoreceu o surgimento de colônias de levedura e de bactérias saprófitas sobre as sementes, e isto, provavelmente, interfira no crescimento das colônias fúngicas objeto da detecção, dificultando esse processo.

Os resultados apresentados e discutidos, relativamente a não interferência do método de restrição hídrica sobre a incidência de *M. phaseolina* sobre as sementes de caupi, reforçam a perspectiva de que esse método pode ser empregado, como rotina, nos testes de sanidade de sementes dessa espécie.

4.4 Conclusões

1. O método de restrição hídrica, empregando o soluto NaCl a –0,8MPa de potencial hídrico, mostrou-se eficiente para inibir o processo germinativo das sementes de caupi.

2. A incidência de *M. phaseolina* não foi afetada pelo método de restrição hídrica, diferente do observado para o congelamento.

3. Em níveis baixos de incidência de *M. phaseolina* nas sementes, o método da restrição hídrica foi tão sensível quanto o congelamento; em níveis médios e altos, o congelamento tende a subestimar os valores de incidência do patógeno.

5 DETECÇÃO DE *Macrophomina phaseolina* EM AMOSTRAS DE SEMENTES DE CAUPI ORIUNDAS DAS REGIÕES NORTE E NORDESTE DO BRASIL

Resumo

A podridão cinzenta do caule do caupi (*Vigna unguiculata*), causada por *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., é uma das mais importantes doenças fúngicas da cultura. O patógeno é eficientemente transmitido pelas sementes, o que representa um risco elevado de disseminação do mesmo para áreas indenes. A esta realidade, pode-se acrescer aquela que resulta do aumento da distribuição de isolados entre áreas produtoras, constituindo-se em uma maior ameaça ao cultivo, pelo aumento da variabilidade patogênica. Assim, este trabalho objetivou avaliar a qualidade sanitária das sementes em 119 amostras originárias de diferentes regiões do país, com foco à detecção de *M. phaseolina*. Empregou-se o método do papel de filtro com restrição hídrica (NaCl a –0,8Mpa), sendo utilizadas 400 sementes/amostra. Os resultados mostraram que *M. phaseolina* foi detectado em 62% das amostras analisadas, sendo as maiores incidências verificadas naquelas originadas dos Estados da Paraíba, Piauí, Pará e Bahia, com valores médios de 25 %, 12%, 19%`e 10%, respectivamente. Observou-se, ainda, diferença na incidência do patógeno considerando a cor do tegumento. As sementes com tegumento branco apresentaram as maiores médias (24%), quando comparadas com as de tegumento marrom (1%) e creme (0,5%).

Detection of *Macrophomina phaseolina* on cowpea seed from northern and north-eastern regions of brazil

Summary

The charcoal rot disease of cowpea (*M. phaseolinal*) is important disease from cowpea crops the world. The causal agent is a seed borne pathogen with great efficiency to be transmited by seed. Beside the transport of infected seed may be increase risk to disseminate fungi isolates for free-pathogen-areas and/or to increase the severity of disease in the endemic regions. This work aim to evaluate the presence of *M. phaseolina* on 119 seed lots originated from northern and north-eastern regions of Brazil. The work was carried out in the Seed Pathology Laboratory of the São Paulo University (ESALQ/USP). To detecting the pathogen was used the blotter test method, with hidric restriction (NaCl -0,8 Mpa) and 400 seeds/sample. *M. phaseolina* was isolated from 62% the samples. The higher incidence was identified in Paraíba (25%), Pará (19%), Piauí (12%) and Bahia (10%) Brazilian seeds lots states. On the white seed tegument was observed the highest incidence to pathogen (24%), differently this one brown (1%) and cream (0,5%) colour tegument seeds.

5.1 Introdução

O fungo *Macrophomina phaseolina* é agente causal de uma importante doença do caupi, denominada podridão cinzenta do caule. Esta enfermidade foi observada pela primeira vez no Brasil, no município de Campinas-SP, em 1935, atacando plantas de feijão comum (Coelho Neto, 1994). Conforme Abawi & Pastor-Corrales (1990), a doença se manifesta atacando caule e raiz e determinando graves prejuízos em muitos países onde a cultura é implementada.

O patógeno *M. phaseolina* é uma espécie polífaga e cosmopolita (Machado, 1980; Sinhg et al.,1990; Mihail, 1992). Nas condições do Brasil, a doença está presente em todas as áreas produtoras (Rios, 1988; Ponte, 1996; Pio-Ribeiro & Assis Filho, 1997; Athayde Sobrinho et al., 1998; Athayde Sobrinho et al., 2000) e, conforme Pio-Ribeiro e Assis Filho (1997), torna-se mais severa quando as condições ambientes mostram-se secas e com temperaturas elevadas.

Como resultado de sua ação parasitária, o patógeno pode infectar também a semente, cuja associação pode resultar em baixo poder germinativo das mesmas (Barros, 1981), além de garantir inóculo primário. Para Vechiato et al. (1997), o patógeno nas sementes tem garantida sua sobrevivência temporal, bem como sua distribuição espacial, o que pode culminar na introdução do patógeno em áreas isentas, sobretudo quando o fungo se aloja internamente nas sementes (Sackston, 1969).

Alguns estudos têm revelado a presença de *M. phaseolina* nas sementes de caupi nas condições do Brasil (Bolkan et al., 1978; Barros, 1980; Barros & Menezes, 1981; Oliveira, 1981; Araújo, 1985; Choudhury, 1987). O patógeno tem sido, também, relatado em outros países em associação com as sementes de caupi (Nakawura et al., 1997; Abdelmonem, 2000).

As sementes melhoradas, apesar de serem um dos mais importantes insumos agrícolas, têm sido pouco usadas pelos produtores de caupi. Conforme Freire Filho[4], menos de 0,5% da área plantada com a espécie usa sementes melhoradas. Isso tem fomentado uma ação dirigida de diversos segmentos do setor produtivo no sentido de estimular o uso de sementes de qualidade superior.

Tal procedimento, irá promover um incremento no fluxo de sementes entre as regiões produtoras, aumentando, portanto, os riscos de disseminação de patógenos importantes como *M. phaseolina.* Isso se constitui em problema a ser antevisto e para o qual devem ser desenvolvidas estratégias visando dirimi-

[4] FREIRE FILHO, F.R. Comunicação pessoal, 2000.

lo. Entre algumas estratégias está o conhecimento da intensidade da presença do patógeno nas sementes.

Assim, o objetivo deste trabalho foi efetuar um levantamento da incidência de *M. phaseolina* em sementes de caupi provenientes de diferentes estados das Regiões Norte e Nordeste do Brasil, definindo um perfil sanitário das mesmas quanto à manifestação do referido patógeno.

5.2 Material e Métodos

Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia da ESALQ/USP, em Piracicaba.

Foram avaliadas 119 amostras de sementes de caupi, provenientes de diferentes Estados das Regiões Norte e Nordeste do Brasil, produzidas nas safras 2000/01 e 2001/02 (Tabela 5). Nesse universo amostral foram avaliadas amostras produzidas em áreas de produção de grãos, de sementes fiscalizadas/registradas e de áreas experimentais, tais como campos de produção de sementes básica e genética. A articulação para coleta e processamento das amostras ficou a cargo da Embrapa Meio-Norte, em Teresina-PI. Logo após a coleta, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Sanidade de Sementes da ESALQ/USP, onde foram armazenadas em condições de câmara fria e seca a 8ºC e 45% de umidade relativa.

Para a detecção do fungo presente às sementes, adotou-se o método do papel de filtro com restrição hídrica (NaCl –0,8MPa), conforme Athayde Sobrinho et al. (2002b), sendo empregadas 400 sementes/amostra.

Na identificação de *M. phseolina* consideraram-se algumas características morfológicas, relacionadas ao hábito de crescimento e presença de microesclerócios, apoiando-se em dados disponíveis na literatura.

As sementes foram incubadas durante sete dias em ambiente controlado, com temperatura de 20±2ºC, em regime de alternância luminosa

(luz fluorescente/escuro), com fotofase de 12 horas. Avaliou-se a incidência de *M. phaseolina* em todas as amostras analisadas.

5.3 Resultados e Discussão

O levantamento revelou presença de *M. phaseolina* em 62% das amostras de sementes analisadas, sendo que 100% das procedentes do estado da Paraíba apresentaram *M. phaseolina*, seguido pelo estado do Pará, Bahia, Maranhão, Pernambuco, Piauí e Ceará. Os níveis médios de incidência nas amostras variaram de 0% a 71% (Tabela 5). Este nível de ocorrência foi verificado em amostras da cultivar Tracuateua, originado do Estado do Pará. Vale destacar que esse Estado está situado em uma região de clima favorecido, não sujeita a ocorrência de seca nem de veranicos, como verificadoas nas regiões semi-áridas do país. Tal nível de ocorrência, em sementes produzidas nesta Região, ainda não havia sido relatado em outros trabalhos.

Tabela 5. Incidência de *M. phaseolina* em amostras de sementes e grãos de caupi produzidos em alguns estados do Brasil, safras 2000/01 e 2001/2002

Estado	Amostras com *M. phaseolina* (%)	Cultivar	Cor do tegumento	Incidência (%)
BAHIA	75,0	Fradinho	Branco	35,0
		Quebra cadeira	Branco	12,0
		Canapu amarelo	Marron	14,0
		Canapu	Creme	1,0
		Canapu	Creme	0,7
		Fradinho	Branco	0,4
		Fradinho	Branco	5,0
		Gurguéia	Marron	7,5
		Mulato	Marron	0,5
		Mulato	Marron	0,0
		Mulato	Marron	0,0
		Mulato	Marron	0,0
CEARÁ	16,7	Sempre Verde	Creme	0,0
		Canapu	Creme	0,0
		Fradinho	Creme	0,3
		Setentão	Marron	0,0
		Epace 10	Marron	0,0
		Fradinho	Branco	1,8
		CE 01	Marron	0,0
		CE 07	Marron	0,0
		CE 315	Marron	0,0
		CE 419	Marron	0,0
		CE 432	Marron	0,0
		CE 441	Marron	0,0
		Epace 10	Marron	0,0
		Branquinho	Branco	0,3

Tabela 5. Incidência de *M. phaseolina* em amostras de sementes e grãos de caupi produzidos em alguns estados do Brasil, safras 2000/01 e 2001/2002

Estado	Amostras com *M. phaseolina* (%)	Cultivar	Cor do tegumento	Incidência (%)
MARANHÃO	60,0	Manteguinha	Marron	7,0
		Branquinho	Branco	3,0
		Roxinho	Marron	0,5
		Maratoã	Marron	1,0
		Gurguéia	Marron	0,0
		Roxinho	Marron	0,0
		Gurguéia	Marron	8,0
		Evx 54-4E	Marron	0,0
		TE-9736 9G-4	Branco	10,0
		Rouxinol	Marron	0,0
		Rouxinol	Marron	0,0
		Guaribas	Branco	14,5
		Maratoã	Marron	1,3
		Rouxinol	Marron	0,5
		Parnaíba	Marron	0,0
PARÁ	82,0	TE 93-413	branco	71,0
		TE 97-3696	branco	20,5
		Tracuateua	branco	0,0
		Tracuateua	branco	10,6
		BRS Taquari	branco	5,8
		Tracuateua	branco	0,0
		Tracuateua	branco	5,3
		Tracuateua	branco	3,3
		Tracuateua	branco	9,0
		Tracuateua	branco	9,3
		Tracuateua	branco	3,3
		Tracuateua	branco	0,0
		Tracuateua	branco	7,0
		Tracuateua	branco	0,0
		Tracuateua	branco	4,3
		Tracuateua	branco	2,5
		Monteriro	branco	3,0
		TE-413-1E-10	branco	8,5
		TE 97-367g-2	creme	5,0
		TE 97-367g-3	marrom	3,0

Tabela 5. Incidência de *M. phaseolina* em amostras de sementes e grãos de caupi produzidos em alguns estados do Brasil, safras 2000/01 e 2001/2002

Estado	Amostras com *M. phaseolina* (%)	Cultivar	Cor do tegumento	Incidência (%)
PARAÍBA	100,0	Bentinho	Marron	20,0
		Travessia	Marron	14,0
		Olho de Peixe	Marron	1,5
		Epace 10	Marron	7,0
		Bentinho	Marron	33,0
		Bentinho	Marron	28,0
		Bentinho	Marron	33,3
		Bentinho	Marron	14,3
		Epace 10	Marron	0,5
		Epace 11	Marron	57,0
		Epace 10	Marron	0,7
		Epace 10	Marron	0,5
		Travessia	Marron	58,0
		IPA206	Marron	17,0
PERNAMBUCO	52,6	IPA 206	Marron	0,0
		Mulato	Marron	0,0
		Epace 11	Marron	1,5
		Epace 10	Marron	0,0
		C-B5	Branco	2,0
		Canapu	creme	0,0
		Balinha	Marron	0,0
		Paulistinha	Marron	1,5
		Canapuzinho	Creme	1,0
		IPA 206	Marron	0,0
		Vita 7	Marron	0,5
		Epace 10	Marron	5,0
		Br 9 Longá	Marron	2,0
		Evx 66-5E	Marron	0,0
		IPA 206	Marron	0,7
		IPA 207	Marron	1,5
		Canapu	Creme	0,0
		Balinha	Marron	0,5
		Epace 10	Marron	0,0

Tabela 5. Incidência de *M. phaseolina* em amostras de sementes e grãos de caupi produzidos em alguns estados do Brasil, safras 2000/01 e 2001/2002

Estado	Amostras com *M. phaseolina* (%)	Cultivar	Cor do tegumento	Incidência (%)
PIAUÍ	44,0	Gurguéia	Creme	0,0
		Vinagre	Marron	0,0
		Guariba	Branco	0,0
		Tracuateua	Branco	41,8
		Gurguéia	Branco	3,5
		Monteriro	Branco	33,0
		TE 97-637 G-3	Branco	6,3
		Tracuateua	Branco	19,0
		Tracuateua	Branco	0,5
		Tracuateua	Branco	30,0
		Tracuateua	Branco	16,0
		Tracuateua	Branco	0,0
		Tracuateua	Branco	9,5
		Rouxinol	Marron	0,0
		CnCx 409	Marron	0,0
		Vagem roxa	Creme	0,0
		Bastião	Marron	0,0
		Mulato	Marron	0,0
		Marronzinho	Marron	6,0
		Brancão	Branco	0,0
		Vita 7	Marron	0,0
		Parnaíba	Marron	0,0
		Olho marron	Branco	3,8
		Rouxinol	Marron	0,0
		Monteiro	Branco	0,0

Considerando a origem das amostras, a analise dos dados revelaram, que as maiores incidências médias foram verificadas em amostras originadas no Estado da Paraíba (20,4%), seguidas pelas do Pará (8,16%), Piauí (6,84%) e Bahia (6,13%) (Figura 7). Estes resultados, em parte, confirmam os dados

encontrados por Oliveira (1981), nos quais *M. phaseolina* foi detectado em quase todas as amostras analisadas, apresentando, aproximadamente, os mesmos níveis médios de incidência. O fato de se verificar altas incidências em amostras procedentes dos Estados da Paraíba e Piauí, pode ser explicado pela prevalência da podridão cinzenta do caule em áreas sujeitas a seca e/ou veranicos, durante o ciclo produtivo (Pio-Ribeiro & Assis Filho, 1997). Relativamente à alta incidência como a que foi observada na cultivar Tracuateua, tais valores foram também referidos por Athayde Sobrinho et al. (1998), na cultivar Br 9 Longá, para as condições do Estado do Piauí.

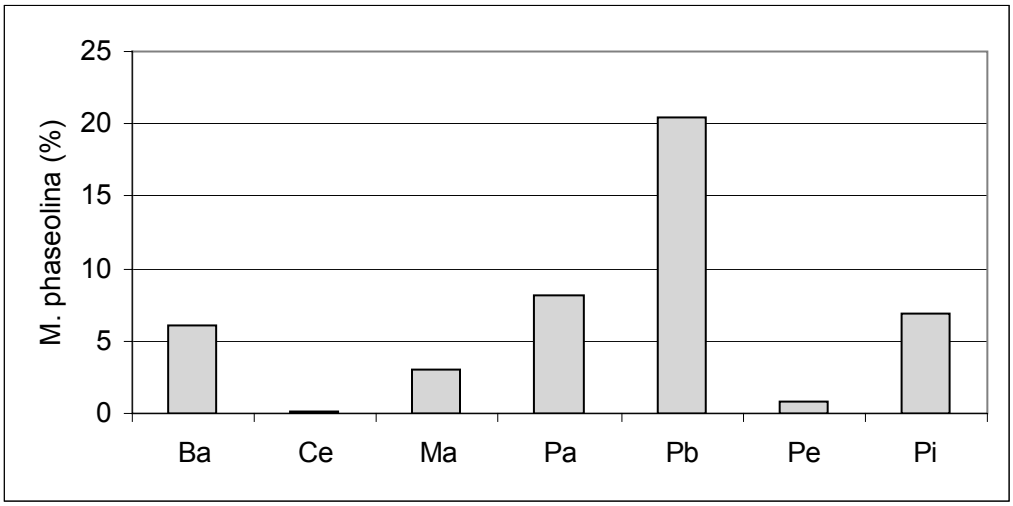

Figura 7 – Incidência média de *M. phaseolina* em amostras de sementes de caupi, conforme o Estado de origem das amostras analisadas

Analisando-se os dados relativos à incidência de *M. phaseolina*, considerando aspectos da cor do tegumento, observou-se uma tendência de maiores incidências em sementes que possuem tegumento branco (Figura 8).

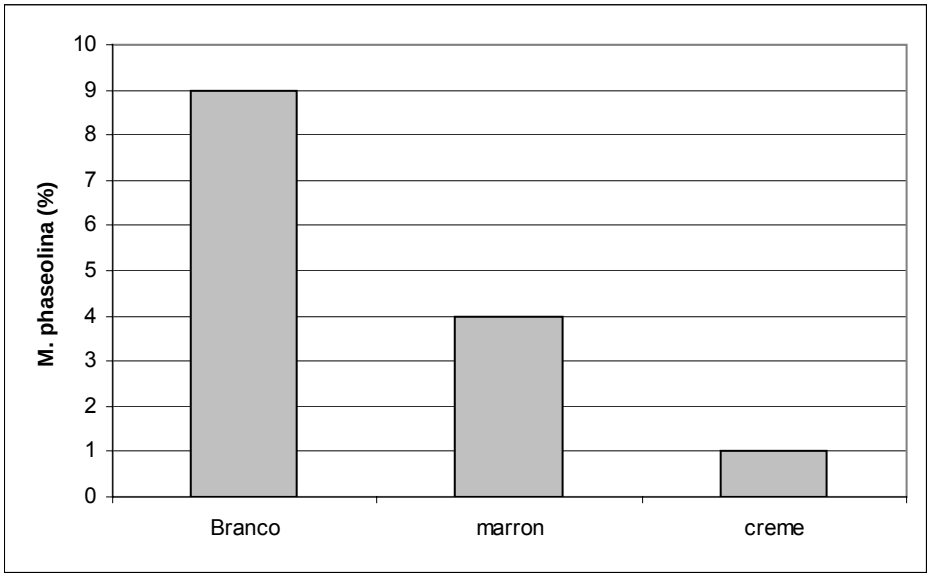

Figura 8 – Incidência média de *M. phaseolina* em amostras de sementes de caupi produzidas na Região Norte e Nordeste do Brasil, conforme cor do tegumento

Embora os dados venham indicar a tendência de que genótipos com cor de tegumento branco apresentem maior incidência do patógeno, mais estudos deverão ser conduzidos com intuito de confirmar essa observação, pois, uma vez confirmado, tal conhecimento pode, inclusive, vir a ser usado como marcador fenotípico de suscetibilidade ao patógeno.

5.4 Conclusões

1. O fungo *M. phaseolina* foi detectado em 62% das amostras de sementes analisadas, estando presente nas amostras do estado da Paraíba (100%), Pará (82%), Bahia (75%), Maranhão (60%), Pernambuco (52,6%), Piauí (44%) e Ceará (16,7%).

2. Os maiores níveis de incidência média do patógeno foram detectados nas amostras originadas dos Estados da Paraíba (20,4 %), Pará (8,16%) Piauí (6,84%) e Bahia (6,13%), sendo que o menor nível encontrado foi para amostras procedentes do Estado do Ceará (0,17%).

3. As sementes com tegumento branco apresentaram maior incidência de *M. phaseolina* (9%), quando comparadas com as de tegumento marrom (3%) e creme (1%).

6 EFEITO DE DISCOS FOLIARES DE DIFERENTES HOSPEDEIROS SOBRE A ESPORULAÇÃO DE *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.

Resumo

Este trabalho objetivou estudar o efeito de discos foliares de plantas de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], trigo (*Triticum aestivum* L.) e milho (*Zea mays* L.) sobre a esporulação do fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP. O experimento foi montado em arranjo fatorial 2 X 5 (temperatura X substrato de esporulação), com quatro repetições. A parcela experimental constou de uma placa de Petri contendo meio BDA, sobre o qual foram depositados seis discos de 15 mm de diâmetro de folhas das espécies vegetais mencionadas, sendo utilizadas as temperaturas de incubação de 25º C e 30º C, em regime de luz fluorescente do dia contínua. Como controles, empregaram-se disco de papel de filtro e meio BDA, sem adição de discos de qualquer natureza. No centro de cada placa foi depositado um disco (0,4 cm de Ø) de meio BDA colonizado pelo micélio *M. phaseolina*. A avaliação foi realizada aos nove dias de incubação, através da estimativa do número de conídios/discos/placa. Os dados foram submetidos a ANAVA, seguido de teste de comparação múltipla de médias (Tukey) a 1% de probabilidade. A melhor esporulação foi obtida em discos de trigo incubados a 25º C ($42,6 \times 10^{3}$ conídios.mL^{-1}.$disco^{-1}$).

Effect of foliar disks on *Macrophomina phaseolina* sporulation

Summary

The effect of foliar disks (15 mm diameter) of wheat (*Triticum aestivum*), corn (*Zea mays*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) on sporulation of *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. causal agent of charcoal rot of cowpea was studied. The fungal isolate was from Piauí State, Brazil, and the work was carried out at the Seed Pathology Laboratory of São Paulo University (ESALQ/USP), under growth chamber at two temperatures (25º C and 30° C) and under continuous light conditions. The results showed ($P \leq 0,01$) that the best conditions for sporulation were foliar wheat disk at 25°C, with $42,6 \times 10^{3}$ conidia. $mL^{-1}.disks^{-1}$.

6.1 Introdução

O fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. é uma espécie mitospórica, sendo a única representante do gênero *Macrophomina* (Subdivisão Deuteromycotina, Classe Deuteromycetes, Subclasse Coelomycetidae, Ordem Sphaeropsidales, Família Sphaeropsidaceae) (Sutton 1980; Menezes & Oliveira 1993). Constitui-se em um patógeno severo, que ataca uma ampla gama de espécies cultivadas, incluindo milho (*Zea mays* L.), soja [*Glycine max* (L.) Merril], gergelim (*Sesamum indicum* L.), amendoim (*Arachis hypogea* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], entre outras (Machado, 1980; Sinhg et al., 1990; Mihail, 1992).

Em plantas de caupi, o fungo causa a doença conhecida como podridão cinzenta do caule, podendo, de acordo com Rodrigues et al. (1997), ocorrer em diferentes fases de crescimento da planta. Nas condições do Nordeste brasileiro, Ponte (1996) e Athayde Sobrinho et al. (2000) destacam que a doença se manifesta inicialmente no colo, atingindo, posteriormente, a raiz

pivotante e as partes superiores do caule e ramos primários, onde são observadas lesões acinzentadas, difusas, de aspecto úmido, que evoluem para intensa podridão dos tecidos. Dependendo da severidade, pode ocorrer a desagregação total ou parcial do parênquima e feixe vascular, resultando em amarelecimento generalizado, murcha, seca e morte das plantas. Na superfície das lesões, normalmente, são verificados inúmeros corpos de frutificação escuros (picnídios), em contraste com o fundo acinzentado que permeia toda a lesão (Mathur, 1967; Kulkarni & Patil, 1968). Todavia, a produção destas estruturas, em meios artificiais de cultivo, não tem sido obtida com freqüência, salvo para alguns isolados (Ashworth, 1959; Dhingra & Sinclair, 1978).

Trabalhos relacionados com o comportamento reprodutivo de fungos têm demonstrado que muitas espécies transmitidas por sementes, quando isoladas e cultivadas artificialmente, perdem, com freqüência, a capacidade de esporulação (Srinivasan et al., 1971).

Um dos artifícios empregados, visando contornar o problema, tem sido o uso de extratos ou partes de plantas hospedeiras (fragmentos de folhas, caules, raiz etc.) adicionados ao meio de cultura (Ostazeski, 1964; Goth & Ostazesk, 1965; Srinivasan et al., 1971). Em muitos casos, a iniciativa tem conseguido êxito, embora, em certas situações, tal recurso tenha se mostrado ineficaz (Dhingra & Sinclair, 1978). Chidambaram & Mathur (1975), utilizando isolados de *M. phseolina* provenientes de diferentes hospedeiros, compararam meios contendo folhas de alguns cereais e obtiveram resultados promissores quanto a produção de picnídios férteis. Nessa mesma linha de trabalho, Machado (1980) induziu, em alguns isolados, maiores taxas de produção das referidas estruturas sobrepondo papel de filtro ao meio agarizado.

O substrato de crescimento, o fotoperíodo e a qualidade da luz foram fatores destacados por Chidambaram & Mathur (1975), como interferentes no processo reprodutivo de *M. phaseolina*. Os autores conseguiram maiores taxas de produção de picnídios quando colocaram as colônias fúngicas em meio agarizado contendo folhas de trigo e sob luz com comprimento de onda

próximo ao ultravioleta (*near ultraviolet light-NUV*). Eles observaram, ainda, que tais tratamentos estimularam a reprodução da maioria dos isolados, embora alguns não tenham respondido de forma positiva.

Dhar et al. (1991) corroboraram a importância do fator luz na esporulação. Estes autores verificaram que as maiores taxas foram obtidas sob exposição diária de 12 horas luz/12h escuro, durante todo o período de incubação, e que um ligeiro aumento na duração do período escuro foi suficiente para inibir o processo de esporulação. Machado (1980) demonstrou que referido processo foi igualmente estimulado, tanto na condição de claro contínuo, quanto em alternância luminosa com fotofase de 12 horas. O autor destacou, ainda, que alguns isolados somente conseguiram esporular quando submetidos à condição de luz contínua.

A importância da produção de picnídios férteis em condições experimentais é inquestionável (Lutrell, 1946), sobretudo quando se busca realizar estudos relacionados à patogenicidade do fungo (Walker 1965), bem como identificar e desenvolver fontes de resistência à doença por ele provocada. Athayde Sobrinho et al. (2003) destacaram a dificuldade encontrada nas inoculações de plantas de caupi, tanto para avaliar patogenicidade dos isolados, como para a identificação de fontes de resistência em *V. unguiculata* a *M. phseolina*, devido a ausência de produção de conídios em cultivos artificiais. As tentativas levadas a efeito, usando suspensão de micélio e/ou esclerócios do fungo, não se mostraram eficazes.

Assim, o presente trabalho objetivou estudar o efeito da temperatura e da superposição, ao meio de cultura BDA, de discos foliares de plantas de caupi (*V. unguiculata*), trigo (*T. aestivum*) e milho (*Z. mays*), sobre a esporulação do fungo *M. phaseolina*, com vistas a subsidiar estudos posteriores relativos à patogenicidade, identificação de fontes de resistência e ao controle da podridão cinzenta do caule.

6.2 Material e Métodos

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP, em Piracicaba, SP.

Empregou-se, no presente estudo, o isolado MP 002, obtido a partir de sementes de caupi, cultivar Fradinho, procedente do Estado do Piauí, e refratário à esporulação em meios artificiais de cultivo.

O experimento foi montado em arranjo fatorial 2 X 5 (temperatura X substrato de esporulação) com quatro repetições. A parcela experimental consistiu de uma placa de Petri contendo meio BDA sobre o qual foram depositados seis discos de 15 mm de diâmetro de folhas de caupi (*V. unguiculata*), trigo (*T. aestivum*) e milho (*Z. mays*), sendo utilizadas as temperaturas de incubação de 25º C e 30º C, em regime de luz contínua. A fonte luminosa empregada constou de lâmpadas fluorescentes brancas do tipo luz do dia.

Nos controles, empregaram-se disco de papel de filtro e também meio BDA, sem adição de discos de qualquer natureza. No centro de cada placa foi depositada uma porção de 0,4 cm de diâmetro de meio BDA colonizado por micélio fúngico, obtido a partir de uma cultura pura com quatro dias de idade de um isolado de *M. phseolina*, cultivado sob regime de alternância luminosa (12 horas escuro e 12 horas luz).

Definidos os tratamentos, o material foi incubado em câmara de crescimento (BOD), marca Tecnal, modelo EP-II, com controle de fotoperíodo e temperatura.

A avaliação foi realizada aos nove dias de incubação, retirando-se os discos de cada tratamento, macerando-os em 2,5 mL de água destilada, para a liberação e ulterior estimativa do número de conídios. Esses dados foram obtidos através da estimativa da média do número de conidiósporos presentes

em cada um dos dois campos da câmara de Neubauer, após prévia filtragem do material coletado.

Para efeito de análise estatística, os dados relativos a esporulação foram transformados em log (x+1), sendo as médias comparadas por meio do teste de Tukey a 1% de probabilidade, conforme Pimentel Gomes (1985). Referida análise foi realizada com o auxílio do procedimento PROC ANAVA do SAS (SAS Institute Inc. 1992).

6.3 Resultados e Discussão

A análise de variância revelou efeito altamente significativo ($P \leq 0,01$) dos fatores temperatura, discos foliares, bem como da interação entre esses sobre a esporulação de *M. phaseolina* (Tabela 6).

Tabela 6. Resumo da análise de variância para esporulação de *Macrophomina phaseolina* sob diferentes substratos (discos) e temperaturas

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Valor F	P >F
Temperatura	1	26,03	26,03	43,28	0,0001
Disco	4	99,11	24,78	41,20	0,0001
Temp. x disco	4	26,98	6,74	11,21	0,0001
Resíduo	30	8,04	0,60		
Total	39	160.16			

Os valores apresentados na Tabela 7 mostram que o fator temperatura, independentemente do fator disco, afetou significativamente a capacidade de esporulação do fungo. Assim, as maiores taxas de esporulação foram obtidas à temperatura de 25º C (15,9 x 10^3 conídios.mL^{-1}.$disco^{-1}$), valor significativamente superior aos obtidos a 30º C (7,9 x 10^3 conídios.mL^{-1}.$disco^{-1}$).

Tabela 7. Influência da temperatura e da superposição de discos foliares ao meio BDA, sobre a esporulação de *Macrophomina phaseolina*

Tratamento	N° conídios (x 10^3.mL^{-1}.$disco^{-1}$)[1]		Média
	Temperatura (º C)		
	25	30	
Disco trigo	42,6 Aa	39,1 Ba	40,85 A
Disco milho	34,8 Ab	0,0 Bb	17,40 B
Disco caupi	1,95 Abc	0,0 Ab	0,97 BC
Sem disco (BDA)	0,39 Acd	0,37Ab	0,38 CD
Disco papel	0,0 Ad	0,0Ab	0,00 D
Média	15,9 A	7,9 B	

[1] Médias de quatro repetições/tratamento. Médias seguidas de mesma letra (minúscula na vertical e maiúscula na horizontal) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Embora não tenham sido encontrados na literatura trabalhos voltados especificamente para a determinação da temperatura ótima de esporulação de *M. phaseolina*, os dados obtidos no presente trabalho são ratificados, em parte, pela existência de um consenso em torno do qual o fungo esporula melhor em faixas de temperaturas mais amenas. Isso foi demonstrado em trabalhos conduzidos por Dhar et al. (1991), onde a produção de picnídios férteis, de quatro isolados de *M. phaseolina*, foi mais facilmente obtida quando foram empregadas temperaturas inferiores a 30ºC. Rodrigues et al. (1997) também destacaram que maiores taxas de fertilidade de picnídios foram conseguidas quando o fungo foi cultivado a 25°C.

Ashworth (1959) e Watanabe (1972), estudando alguns aspectos relacionados com a fisiologia do fungo, concluíram que as melhores taxas de

esporulação são conseguidas quando o mesmo é cultivado em condições ambientes, em que são verificadas flutuações diárias da temperatura.

Considerando-se o fator disco isoladamente, observa-se que as maiores taxas de esporulação ($P<0,01$) foram conseguidas com discos de folhas de trigo ($40,85 \times 10^3$ conídios.mL^{-1}.$disco^{-1}$), que foram superiores àquelas obtidas com discos de milho ($17,40 \times 10^3$ conídios.mL^{-1}.$disco^{-1}$) e de caupi ($0,97 \times 10^3$ conídios.mL^{-1}.$disco^{-1}$), os quais não diferiram entre si. O efeito dos discos de folhas de caupi foi, por sua vez, semelhante à testemunha, sem disco (BDA), o qual mostrou-se semelhante ao efeito obtido com disco de papel (Tabela 7). Resultados similares a estes foram obtidos por Chidambaram & Mathur (1975). Os autores, estudando o efeito do emprego de folhas de trigo, aveia, cevada, sorgo e milheto, adicionado ao meio de cultivo, concluíram que, para alguns isolados, as maiores taxas de produção de picnídios foram também conseguidas com o emprego de folhas de trigo.

A superioridade apresentada pela presença de folhas de trigo no meio pode estar relacionada, em parte, aos requerimentos nutricionais específicos à reprodução (Cochrane, 1958; Griffin, 1994). Provavelmente, as folhas desse cereal contêm certos atributos nutricionais (vitaminas e/ou hormônios) que estimulam o processo reprodutivo do fungo (Hawker, 1957). A esse respeito, Lilly & Barnett (1951) destacam que muitos fungos, quando cultivados em substratos naturais, têm à sua disposição certas substâncias que podem, às vezes, atender especificidades nutricionais exigidas na reprodução de forma mais eficiente que os meios sintéticos ou semi-sintéticos.

Um aspecto merecedor de destaque, diz respeito à possibilidade de o fungo ser estimulado a se reproduzir sobre os discos de folhas e de papel de filtro devido a repostas relacionadas ao tigmotropismo, em função do substrato. Assim, Reis (1973) e Rodrigues et al. (1997b) referem que o papel de filtro pode funcionar alterando a topografia do meio, de forma a aumentar a superfície de contato, incrementando a esporulação. Por sua vez, Machado (1980) sugere que o aumento da esporulação verificado, nesse caso, pode ser devido à

utilização da celulose pelo fungo. Tais assertivas, todavia, mostram-se pouco consistentes para justificar os resultados obtidos neste trabalho, devido a ausência de esporulação verificada nos tratamentos papel de filtro e folhas de milho e caupi a 30ºC (Tabela 7). Supõe-se, todavia, que nesses tratamentos, além de ocorrer idênticos estímulos tigmotróficos, estão disponíveis também significativas quantidades de celulose.

Por outro lado, o fenômeno parece ser mais bem explicado por Hawker (1957) e Hawker (1966), quando se refere a um comportamento diferencial mostrado por fungos da ordem Sphaeoropsidales, ao serem submetidos à flutuações na qualidade nutricional do meio de cultivo. O autor afirma que a transferência do fungo de um meio nutricionalmente rico para um outro mais pobre, tem-se mostrado efetivo em estimular a esporulação, devido a um ligeiro "choque" nutricional. Isso pode explicar, em parte, o fenômeno verificado neste trabalho. O fungo, ao crescer sobre o meio BDA, nutricionalmente rico e com alta disponibilidade de nutrientes, foi estimulado a desenvolver-se vegetativamente, sem necessidade de se reproduzir. Quando o mesmo, pelo seu crescimento natural, atinge os discos, passando a nutrir-se a partir desse substrato, onde os nutrientes, provavelmente, encontram-se pouco disponíveis, ocorre então a referida transição e, nesse caso, o fungo é estimulado a desencadear seu processo reprodutivo. O autor enfatiza, ainda, que mudanças bruscas podem não ser efetivas para desencadear a reprodução, o que pode explicar a ausência de esporulação observada nas folhas de papel, milho e caupi acima destacada. Esse comportamento parece estar também apoiado nos princípios de Klebs (Griffin, 1994) quando afirma, entre outros aspectos, que o processo reprodutivo dos fungos é dependente da exaustão de nutrientes.

Analisando-se os dados do ponto de vista da interação discos versus temperatura, observa-se que as maiores taxas de esporulação foram verificadas quando, ao meio BDA, foram adicionados discos de folhas de trigo. Os resultados revelaram valores de 42,6 e 39,1 x 10^3 conídios.mL^{-1}.$disco^{-1}$,

respectivamente, para as temperaturas de 25º C e 30º C, sendo significativamente superiores aos demais tratamentos. Esses resultados estão de acordo com os de Chidambaram & Mathur (1975), onde as maiores taxas de esporulação foram obtidas quando, ao meio, foram adicionados fragmentos de folhas de trigo, aveia e cevada, com ênfase para o emprego de folhas de trigo.

Os resultados mostraram, ainda, que discos de folhas de milho, quando submetidos à temperatura de 25º C, também podem estimular a esporulação do fungo a um nível próximo ao obtido com folhas de trigo. Tais resultados demonstram que a interação folha de milho versus temperatura de 30º C é, sobremodo, desfavorável à esporulação. A afirmação de Hawker (1957) pode explicar o fenômeno. O autor afirma que a temperatura, interagindo com outros fatores externos, pode mascarar ou alterar a natureza de seu efeito sobre o fenômeno. Hawker (1957) demonstrou que a temperatura ótima para a formação de peritécio em *Sordaria fimicola* é significativamente mais baixa quando, no meio de cultura, a fonte de carbono disponível é glicose, ao invés de sacarose.

Assim, na combinação folhas de milho versus temperatura de 30º C na qual a esporulação foi zero, diferentemente de 25º C (34,80 x 10^3 conídios.mL^{-1}.$disco^{-1}$), pode ter ocorrido um fenômeno parecido ao verificado com *S. fimicola*.

A Figura 9 mostra detalhes da formação de picnídios e microesclerócios sobre os diferentes substratos comparados. Em discos de folhas de trigo, observou-se que os picnídios apresentaram-se com maior dimensão e mais individualizados, mostrando pouca ou nenhuma formação de microesclerócios, indicando, assim, que as condições foram favoráveis à esporulação. Sobre BDA foram observadas abundantes quantidades de microesclerócios e insignificantes quantidades de picnídios, cuja presença justifica o aparecimento de alguns conídios (0,58x 10^3 conídios.mL^{-1}.$disco^{-1}$), mostrados na Tabela 7.

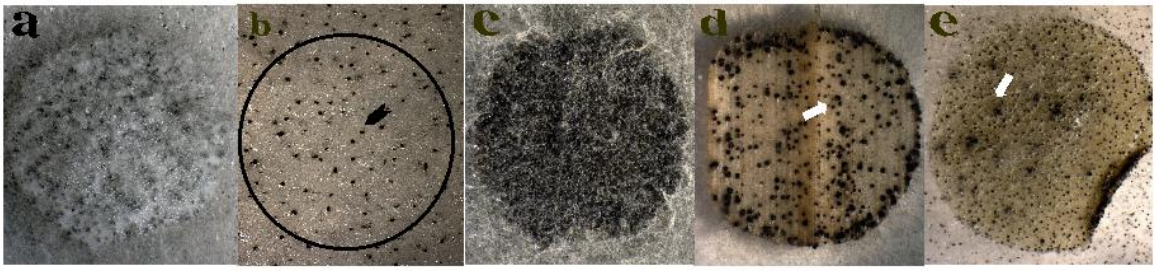

Figura 9 - Detalhe da formação de picnídios (seta clara) e microesclerócios (seta escura) sobre diferentes substratos: A – Papel; B – BDA; C – Milho ; D – Trigo; E – Caupi

6.4 Conclusões

1. A temperatura de 25º C proporcionou valores significativamente mais elevados de esporulação de *M. phaseolina* (15,7 x 10^3 conídios.mL^{-1}.$disco^{-1}$).
2. A superposição de discos de folhas de trigo ao meio BDA foi responsável por níveis significativamente maiores de esporulação de *M. phaseolina* (40,45 X 10^3 conídios.mL^{-1}.$disco^{-1}$).

3. Os maiores índices de esporulação foram obtidos com a combinação de discos de folhas de trigo com temperatura de 25º C (42,6 x 10^3 conídios.mL^{-1}.$disco^{-1}$.).

7 CONTROLE DE *Macrophomina phaseolina* EM CAUPI ATRAVÉS DA APLICAÇÃO DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA NAS SEMENTES

Resumo

Sementes de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], tratadas com acibenzolar-S-metil (ASM), quitosana e com um produto originado de rocha silicatada micronizada (PSiM), foram semeadas juntamente com grãos de arroz infectados com *Macrophomina phaseolina* visando ao controle da podridão cinzenta do caule, uma das mais importantes doenças fúngicas da cultura. O tratamento a base de ASM (25 ppm) mostrou-se efetivo em induzir resistência e controlar a doença. Os demais produtos mostraram-se ineficazes. Os resultados indicaram a possibilidade do uso da resistência induzida como uma alternativa de controle da doença através do tratamento de sementes, por potencializar respostas de defesa na fase inicial de desenvolvimento das plântulas, bem como por manter um bom nível de controle residual da doença até os 40 dias após a emergência.

The control of *Macrophomina phaseolina* in cowpea through the application of resistance inducers in the seeds

Summary

The cowpea seeds [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], treated with acibenzolar-S-methyl (ASM), chitosan and silicate product originated from

micronized rock (PSiM) were sowed together with the rice grains infected by *Macrophomina phaseolina* aiming at to control the charcoal rot disease, one of the most important fungal diseases of the crop. The treatment based on the ASM (25ppm) shown effective in inducing the resistance and controling the disease. The other products were ineffective. The results have pointed out the possibility of using the using the induced resistance as an alternative to control the disease though the seeds treatment, by potentializing of the defense responses in the initial phase of the seedling development, as well as to maintain a good level of residual control of the disease until the 40 days after germination of seeds.

7.1 Introdução

A podridão cinzenta do caule, causada por *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., é uma das mais importantes doenças fúngicas do caupi (Rios 1988). Por se tratar de um patógeno eficientemente transmitido pelas sementes e com uma ampla capacidade de sobrevivência no solo, constitui-se em um importante fator limitante à expansão dos rendimentos da cultura. Dados do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (2002) indicam rendimento médio da cultura oscilando em torno de 332 kg/ha, muito abaixo do rendimento potencial da espécie, que supera os 2500 kg/ha (Cardoso et al., 1995; Freire Filho et al., 1997; Cardoso et al., 2000).

Para o controle da doença, em outros patossistemas, tem sido recomendado o uso de fungicidas e de cultivares resistentes. Para o caupi, sequer existem fungicidas registrados, o que representa uma séria limitação. Dessa forma e em função do perfil do produtor de caupi (Frota & Pereira, 2000), pouco afeito à adoção de medidas sanitizantes tradicionais em seu sistema de produção, o controle das principais doenças da cultura deve ser o mais natural possível.

Diante dessa realidade, para efetivamente impactar as práticas de manejo das doenças da espécie, o passo inicial é avaliar e estimular o uso de medidas naturais de controle, que apresentem baixo risco. Entre elas destaca-se o uso de agentes indutores de resistência, os quais, conforme Pascholati & Leite (1995), constituem-se em substâncias químicas, fatores físicos e microrganismos (viáveis ou inativados) que possuem a capacidade de estimular os vários mecanismos de defesa das plantas. Preferivelmente, estes indutores deverão apresentar ação sistêmica e efeito prolongado, de fácil uso e de baixo risco de intoxicação humana e contaminação ambiental.

Diversas substâncias naturais ou sintéticas, dotadas da capacidade de estimular a resistência induzida, vêm sendo utilizadas no controle de agentes de doenças em vários patossistemas (Moraes, 1998; Cavalcanti, 2000; Oliveira et al., 2004). Dentre as sintéticas destacam-se o ácido salicílico (AS), o ácido 2,6-dicloroisonocotínico (INA) (Kessmann et al., 1994) e, especialmente, uma molécula bastante estudada, derivada do ácido salicílico, acibenzolar-S-metil (ASM) (Kessmann & Ryals, 1996), a qual vem sendo usada comercialmente no manejo de várias doenças. Representando as moléculas naturais, maior ênfase tem sido dada àquelas derivadas de parede celular de patógenos, como glucanas, quitina (e seus derivados), glicoproteínas e peptídeos (Hann, 1996).

Um outro grupo de substância é representado pelos silicatos naturais, derivados de rochas magmáticas, ou de escórias originadas de siderurgia, os quais, por possuírem silício em sua composição, vêm sendo, atualmente, bastante estudados por sua capacidade de controlar doenças de plantas (Cherif et al., 1992; Samuels et al., 1994) e de promover resistência induzida (Pozza et al., 2004).

Não obstante a existência de inúmeros estudos voltados aos aspectos teóricos e práticos do uso da resistência induzida em muitos patossistemas (Benhamou et al., 1994; Sticher et al., 1997; Cavalcanti, 2000; Oliveira et al., 2004; Pozza et al., 2004), os trabalhos especificamente relacionados ao uso da resistência induzida na cultura do caupi são bastante escassos. A única

referência encontrada trata-se do trabalho de Latunde-Dada & Lucas (2001), em que os autores verificaram respostas efetivas de defesa das plantas, conseqüentes à aplicação de ASM em sementes de caupi. Todavia, o volume de informações atualmente disponível é suficiente para sustentar a hipótese de uma provável eficácia do uso estratégico da resistência induzida no controle de doenças da cultura, notadamente a podridão cinzenta do caule.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação de indutores de resistência, via semente, no controle de *M. phaseolina* em caupi.

7.2 Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Patologia de Sementes e em casa de vegetação do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, em Piracicaba-SP. Foram utilizadas sementes de caupi (*V. unguiculata*) cv. Br-17 Gurguéia e um isolado de *M. phaseolina* MP103, obtido de sementes de caupi originarias do Estado do Piauí.

Os produtos testados como indutores foram: acibenzolar-S-metil - ASM (25 ppm); produto silicatado derivado de rocha magmática micronizada (PSiM - 1500 ppm) e quitosana (25 ppm), ordenados em delineamento em blocos ao acaso com oito tratamentos (Testemunha inoculada – MP, ASM, ASM+MP, PSiM, PSiM+MP, quitosana, quitosana+MP e testemunha absoluta -H_2O) e cinco repetições.

A aplicação do ASM e quitosana consistiu na imersão parcial das sementes em suspensão aquosa por 24 e 8 horas, respectivamente. O PSiM, formulação pó-seco, foi aplicado diretamente sobre as sementes, as quais foram previamente umedecidas com água estéril (2 mL de água/100 g de sementes). A parcela experimental constou de um vaso plástico, contendo seis litros de solo arenoso esterilizado, nos quais foram mantidas seis plantas/vaso até a conclusão do experimento.

O inóculo foi representado por cinco grãos de arroz colonizados com o isolado fúngico, o qual foi cultivado sobre grãos de arroz em casca esterilizados, durante 15 dias, em câmara de crescimento para B.O.D, sob fotofase (12 horas luz branca fluorescente/escuro) a 25°C de temperatura. A inoculação foi realizada imediatamente após a semeadura e constou da deposição direta do inóculo sobre as sementes, conforme metodologia modificada de Abawi & Pastor-Corrales (1990).

Avaliaram-se a percentagem de emergência total e de plântulas sadias, aos 12 dias após o início da emergência das plântulas, bem como a severidade da doença. Este último parâmetro foi avaliado a cada dez dias, a partir dos 12 dias após emergência, até aos 52 dias, quando se verificou a completa estabilização do progresso da enfermidade. Para tanto, empregou-se uma escala de notas, adaptada de Abawi & Pastor-Corrales (1990), com variação de 1 a 9, onde 1 = ausência de sintomas visíveis; 3 = discreta lesão necrótica a até 10% do hipocótilo com lesões superficiais; 5 = aproximadamente 25% do hipocótilo apresentando lesões necróticas; 7 = aproximadamente 50% do hipocótilo lesionado, com percepção discreta das estruturas fúngicas e 9 = aproximadamente 75% ou mais dos tecidos do hipocótilo apresentando lesões, sendo observado intenso crescimento fúngico. Os dados de severidade foram utilizados para o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), conforme metodologia de Campbell & Madden (1990). Os dados obtidos a partir da AACPD e os resultantes da avaliação de percentagem de emergência total e percentagem de emergência de plântulas sadias foram submetidos a análise de variância, seguido do teste de Tukey para comparação das médias. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do procedimento PROC ANAVA do SAS (SAS Institute Inc. 1992).

7.3 Resultados e Discussão

Os dados de percentagem de emergência total e de plântulas sadias obtidos aos 12 dias foram suficientes para discriminar o efeito dos tratamentos (Tabela 8). A análise de variância dessas variáveis detectou diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os diferentes indutores avaliados.

Tabela 8. Percentagem de emergência total e de plântulas sadias de caupi, obtidas de sementes tratadas com três indutores de resistência e desafiadas por *M. phaseolina*, sob condições de casa de vegetação

Tratamento	Emergência (%)[1]	Plântulas sadias (%)[1]
Testemunha absoluta (H_2O)	98,0 a	100,0 a
ASM	84,0 a	100,0 a
PSiM	98,0 a	100,0 a
Quitosana	86,0 a	100,0 a
Testemunha inoculada (MP)	76,0 ab	0,0 c
ASM + MP	84,0 a	64,8 b
Quitosana + MP	54,0 bc	7,2 c
PSiM + MP	44,0 c	0,0 c
CV (%)	16,5	7,2
DMS	25,8	8,6

[1] Médias de cinco repetições; médias seguidas de mesma letra, na vertical, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Com relação a percentgem de plântulas emergidas, observou-se que o tratamento com ASM+MP foi o que possibilitou os melhores níveis, cujos valores não diferiram significativamente da testemunha absoluta (H_2O), nem dos demais tratamentos não inoculados. Esses dados mostram o efeito positivo do ASM, provavelmente estimulando o sistema de defesa vegetal, com o conseqüente controle do patógeno nas fases iniciais do desenvolvimento das

plântulas (Capítulo 8). Resultados semelhantes foram obtidos por Latunde-Dada & Lucas (2001), ao induzirem resistência em caupi contra *Colletotrichum destructivum*, através da aplicação do ASM às sementes.

Os dados relativos aos tratamentos com PSIM+MP e quitosana+MP mostraram que ambos produtos foram ineficazes, uma vez que provocaram uma redução significativa da taxa de emergência de plântulas, cujos valores se assemelharam ao da testemunha inoculada com o patógeno sem indutor. Nesses tratamentos foi verificada presença de *M. phaseolina* causando morte de sementes e de plântulas em pré-emergência.

Com relação à percentagem de emergência de plântulas sadias, observou-se comportamento semelhante ao verificado para percentagem de emergência total, onde o ASM+MP mostrou-se superior aos demais tratamentos inoculados, embora tenha apresentado valores significativamente menores que os revelados pela testemunha absoluta. Aos 12 dias após a emergência, todas as plântulas dos tratamentos MP e PSiM+MP apresentaram-se doentes, cujos resultados foram semelhantes aos de quitosana+MP.

A ausência de eficácia demonstrada pelo tratamento PSiM+MP pode ser explicada pela dose empregada sobre as sementes (1500 ppm), a qual, após a semeadura, pode ter sido reduzida por diluição na solução do solo, tornando-se conseqüentemente inefetiva. Em outras interações, o emprego de silício tem apresentado respostas favoráveis. É o caso, por exemplo, do patossistema *Sphaerotheca fuliginea*-pepino, em que a aplicação de silício mostrou-se efetiva nas doses 1000 ppm, em pulverização foliar, e 100 ppm em solução nutritiva (Menzies et al., 1991). Da mesma forma, o tratamento com quitosana não apresentou controle do patógeno. Isto pode estar associado a pouca especificidade verificada na relação *Macrophomina*-caupi. Por ser *M. phaseolina* um patógeno polífago (Dinghra & Sinclair, 1978), provavelmente os monômeros de quitosana liberados após o contato do produto com as sementes/plântulas, não foram capazes de elicitar respostas do hospedeiro. Esta ausência de reconhecimento pelos sistemas de defesa da planta-alvo,

viabilizou a manifestação da doença, distintamente do que ocorreria nas relações incompatíveis. Diferentes aspectos de sinalização e de especificidade das relações patógeno-hospeiro, que determinam reações de resistência e suscetibilidade, têm sido destacados por diversos autores (Crute et al., 1997; Vidhyasekaran, 1997; Lucas 1998). Dessa forma, quanto maior a especialização patogênica, mais refinado é o sistema de sinalização via elicitores, e mais eficientemente ocorrem os fenômenos de reconhecimento/expressão de defesa por parte do hospedeiro (Crute et al., 1997)

Vale destacar que não foi observado efeito fitotóxico sobre sementes e plântulas resultante da aplicação de nenhum dos indutores, uma vez que os valores de percentagem total de emergência obtidos para ASM, PSiM e quitosana não diferiram significativamente da testemunha absoluta (Tabela 8). Em algumas situações, a aplicação de ASM em sementes pode provocar fitotoxidez dose-dependente. Latunde-Dada & Lucas (2001) observaram acentuada redução no porte de plântulas de caupi originadas de sementes tratadas com solução de 25 ppm de ASM e correlacionaram essa reação ao efeito tóxico do produto, não sendo verificado igual comportamento nas plantas tratadas com doses menores (5, 10 e 15 ppm).

As Figuras 10 e 11 apresentam, respectivamente, os dados relativos à severidade da podridão cinzenta do caule do caupi aos 52 dias após a emergência e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Tal qual verificado para as variáveis percentagens de emergência total e de plantas sadias, o ASM foi o produto que possibilitou os menores valores de severidade da doença, os quais mostraram-se semelhantes aos da testemunha absoluta. Isso revela um controle efetivo da doença e, se manifestado em condições de campo, viabilizará, na prática, o controle da doença por meio da indução de resistência, via tratamento de semente.

A análise temporal do progresso da doença, expressa pela AACPD (Figura 11), permitiu inferir que o produto possui um razoável efeito residual, na

medida em que garantiu níveis baixos da doença até aos 52 dias, quando se observou uma tendência à estabilização do avanço da enfermidade.

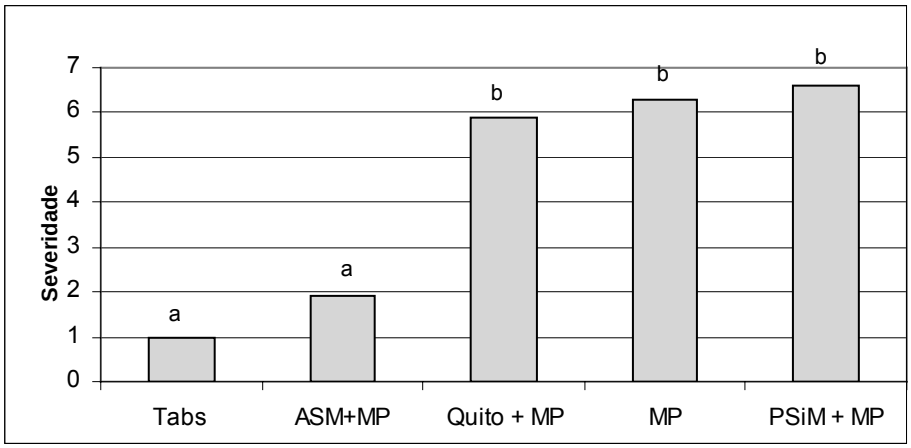

Figura 10 - Severidade da podridão cinzenta do caule em plantas de caupi originadas de sementes tratadas com três indutores de resistência (Tabs=Testemunha absoluta; MP=*M. phaseolina*; Quito=quitosana; PSiM=Produto silicatado micronizado)

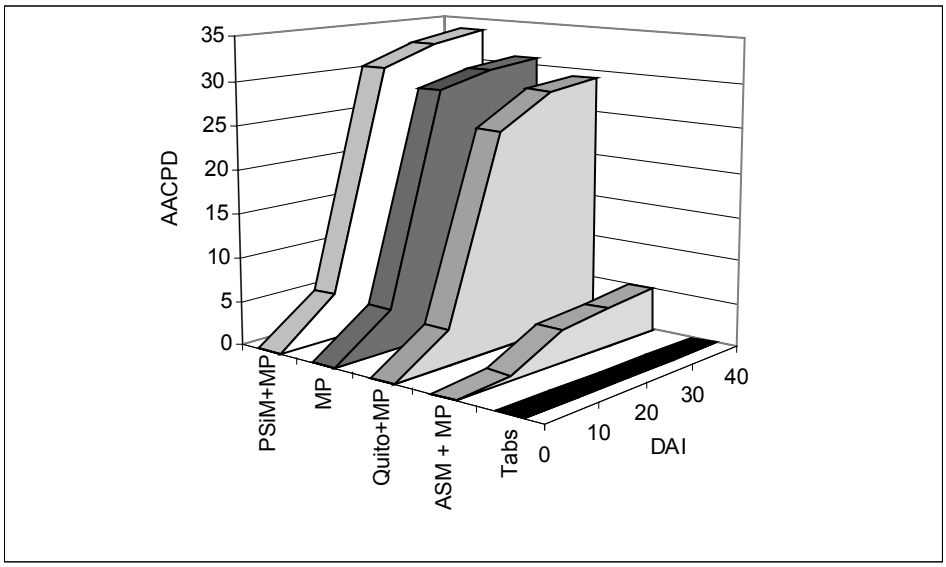

Figura 11 – Área abaixo da curva de progresso da doença (AACCP) da podridão cinzenta do caule em plantas de caupi originadas de sementes tratadas com três indutores de resistência (DAI-dias após inoculação; Tabs=Testemunha absoluta; MP=*M. phaseolina*; Quito=quitosana; PSiM=Produto silicatado micronizado)

Durante a condução deste estudo foi verificada significativa diferença na severidade entre os tratamentos com ASM (plantas induzidas) e planta não induzida e inoculada (MP). As plantas tratadas com o indutor apresentaram-se mais vigorosas. Redução da severidade foi também destacado por Latunde-Dada & Lucas (2001) em plantas de caupi oriundas de sementes tratadas com ASM e desafiadas com *C. destructivum*.

7.4 Conclusões

1. O fungo *M. phaseolina* pode ser eficientemente controlado pela aplicação, via sementes, de acibenzolar-S- Metil (ASM), na concentração de 25 ppm do i.a.

2. O controle de *M. phaseolina* foi verificado tanto pela redução da incidência (emergência de plantas sadias) quanto pela redução da severidade.

3. ASM apresentou expressivo efeito residual até 52 dias após a emergência.

4. Os indutores quitosana e PSiM, nas doses e condições avaliadas, não controlaram o patógeno.

8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS INDUZIDAS POR ACIBENZOLAR-S-METIL NO PATOSSISTEMA CAUPI X *Macrophomina phaseolina*

Resumo

Sementes de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), tratadas com acibenzolar-S-metil (ASM), foram inoculadas com *Macrophomina phaseolina*, agente causal da podridão cinzenta do caule, visando identificar o efeito desta molécula na expressão da resistência induzida, através da alteração na atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL), peroxidases, quitinase e ß-1,3-glucanase. Os resultados mostraram que a atividade das enzimas FAL, peroxidase e quitinase foi afetada pela aplicação de ASM. De uma maneira geral, observaram-se menores níveis de atividade das enzimas FAL, peroxidase e quitinase nos tratamentos inoculados com *M. phaseolina*. As alterações na atividade das enzimas estão relacionadas aos mecanismos de defesa e/ou a espectos relativos ao crescimento e nutrição dos tecidos vegetais. Dessa maneira o ASM apresenta potencial para ser usado, via tratamento de sementes, no controle de *M. phaseolina.*

Defense responses to mediated by acibenzolar-S-methyl in the cowpea X *Macrophomina phaseolina* pathosystem

Summary

The cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seeds treated with acibenzolar-S-methyl (ASM) were inoculated with *Macrophomina phaseolina* to study its effect on plant response based upon the activity of the enzymes phenylalanine ammonia-lyase (PAL), peroxidase, chitinase and ß-1,3-glucanase. The results showed that ASM enhanced PAL, peroxidase and chitinase activity. Thus, ASM might act on the host pathogen interaction between cowpea and *M. phaseolina* as a resistance induced.

8.1 Introdução

O éster do ácido benzo (1,2,3) tiadiazole-7-carbotióico (ASM) tem sido apontado como um dos mais promissores indutores de resistência vegetal (Görlach et al., 1996; Kunz et al., 1997), sendo o primeiro produto comercial de uma nova geração de protetores de plantas (Lyon & Newton, 1997). Esta substância vem sendo empregada como indutor de resistência em várias culturas de interesse agrícola, o qual tem se mostrado mais eficiente na indução de resistência que o ácido salicílico (AS) e o ácido 2,6, dicloroisonicotínico (INA), além de apresentar baixa toxidez (Görlach et al., 1996; Kunz et al., 1997).

Jacobsen & Kiewnick (1998) observaram uma redução na severidade de mancha de *Cercospora* em plantas de beterraba quando da aplicação foliar de ASM. Em trigo, foi observada significativa proteção contra o fungo *Blumeria graminis*, onde se conseguiu, após uma única aplicação do produto, atraso no estabelecimento da epidemia (Stadnik & Buchenauer, 1999). Respostas semelhantes foram observadas na mesma cultura para *Septoria* spp. e *Puccinia* spp. (Venâncio et al., 2000). Na interação café – *Hemileia vastatrix*, o ASM conferiu significativa proteção contra o patógeno (Guzzo et al., 2001). Outros exemplos podem ser verificados em trabalhos realizados por Anfoka (2000), Cavalcanti (2000), Silva (2002) e Resende et al. (2002).

As informações atualmente disponíveis têm destacado os diferentes mecanismos de ação do ASM. Depois de absorvida pelo tecido vegetal, a molécula atua ativando diversos mecanismos bioquímicos, de forma que as plantas originalmente suscetíveis tornam-se sensibilizadas e aptas a responder ao desafio de agentes patogênicos, como se fossem resistentes (Katz et al., 1998).

Siegrist et al. (1998) demonstraram a ação do produto induzindo o aumento da síntese de uma fitoalexina (cumarina) em cevada. Em trabalho realizado por Stadnik & Buchenauer (2000) foi observado que o ASM aumentou a autofluorescência localizada nos sítios de penetração (halo e papila) e, claramente diminuiu a eficiência de penetração do fungo *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, sugerindo que o mecanismo de resistência, nessa interação, estaria relacionado a um rápido acúmulo de compostos fenólicos, nos sítios de penetração.

Em caupi (*Vigna unguiculata*), inoculado com *Colletotrichum destructivum*, maior resistência em plântulas induzidas por ASM, foi associado com um rápido e efetivo aumento na atividade de duas enzimas-chave na via dos fenilpropanóides (fenilalanina amônia-liase - FAL e chalcona isomerase - CHI), que levou a um acelerado acúmulo de substâncias do grupo dos flavonóides, como as fitoslexinas quievitonas e faseolidina (Latunde-Dada & Lucas, 2001).

No patossistema cacau-*Verticilium dahliae*, Cavalcanti (2000) e Resende et al. (2002) observaram aumento na atividade de peroxidases e polifenoloxidases, destacando ser essa uma importante alteração fisiológica no processo de resistência induzida, em resposta à pulverização das plântulas com ASM.

Na interação *Fusarium graminearum* x trigo, Pritsch et al. (2000) verificaram aumento de proteínas relacionadas a patogênese (proteínas-RP) quando as plantas foram previamente tratadas com ASM. Pascholati (1999) observou que a produção de fitoalexinas por plantas de sorgo induzidas por

ASM foi diretamente proporcional à quantidade aplicada do produto. Guzzo et al. (2004) observaram aumento local e sistêmico das atividades de quitinases e ß-1,3-glucanases em plantas de café após a aplicação de ASM. Osswald et al. (2004) observaram acúmulo da fitoalexina apigininidina em mesocótilos de sorgo após a aplicação de 5 ppm de acibenzolar-S-metil.

O produto tem sido normalmente utilizado em pulverizações foliares; entretanto, alguns trabalhos têm demonstrado a sua eficiência, também, através do tratamento de sementes (Jensen et al., 1998; Latunde-Dada & Lucas, 2001).

O presente estudo objetivou investigar a expressão da resistência induzida em caupi (*V. unguiculata*), considerando a atividade de enzimas relacionadas à defesa vegetal, a partir de plantas oriundas de sementes tratadas com ASM e desafiadas por *M. phaseolina*.

8.2 Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Parasitismo e em casa de vegetação do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, em Piracicaba-SP.

As sementes de caupi, *V. unguiculata* cv. Rouxinol, foram obtidas na Embrapa Meio-Norte, em Teresina, PI. Esta cultivar foi selecionada para o presente estudo por sua suscetibilidade a *M. phaseolina*. A aplicação do produto comercial à base de benzotiadiazole (ASM), formulação grânulos dispersíveis a 50% (i.a.) foi realizada através da imersão parcial das sementes em solução aquosa, ajustada a uma concentração de 25 ppm do ingrediente ativo durante 24 horas. Após esse período, as sementes foram colocadas para secar a sombra durante duas horas, sendo, em seguida, semeadas em vasos plásticos (12 sementes/vaso), com capacidade para cinco litros, nos quais foram colocados quatro litros de substrato esterilizado à base de areia fina, solo vegetal e esterco bovino, na proporção 5:1:1, respectivamente. As plantas

foram mantidas em cada de vegetação durante todo o período de condução do experimento.

Empregou-se, como inóculo, o isolado de *M. phaseolina* MP103, obtido de sementes de caupi originárias do Estado do Piauí. O inóculo foi constituído por cinco grãos de arroz “em casca” esterilizados e colonizados com o isolado fúngico, durante 15 dias, em câmara de crescimento tipo B.O.D, com fotofase (12 horas luz branca fluorescente/escuro) e 25°C de temperatura. A inoculação foi realizada imediatamente após a semeadura e consistiu na deposição direta do inóculo sobre as sementes, conforme metodologia modificada de Abawi & Pastor-Corrales (1990)

O experimento foi organizado em delineamento em blocos casualizados, em arranjo fatorial 4 x 9 (tratamentos *versus* tempo de coleta) e três repetições. Os tratamentos foram representados pelo indutor (ASM), indutor + patógeno (ASM+MP), água + patógeno (H_2O+MP) e testemunha absoluta (H_2O). Os tempos de coleta foram: 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas, após a semeadura e inoculação. Cada repetição foi representada por três sementes e/ou plântulas.

Imediatamente após a semeadura e inoculação iniciou-se a coleta das amostras para determinação do teor de proteínas totais e análise da atividade das enzimas peroxidase, ß-1-3-glucanase, fenilalanina amônia-liase (FAL) e quitinase. As plântulas e sementes sem tegumento foram trituradas em pistilo e almofariz, em 10 mL da solução extratora (tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7, + 1 mg ditiotreitol-DTT/mL de tampão) a baixa temperatura, resultando nas amostras diluídas que foram utilizadas em todas as determinações.

O teor de proteínas totais das amostras foi quantificado conforme metodologia de Bradford (1976). Para tanto foram misturados 800 μL da amostra (extrato) com 200 μL do reagente de Bradford concentrado. A mistura foi homogeneizada em Vortex e, após 5 min, efetuou-se mensuração da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm.

Para a atividade da fenilalanina amônia-liase utilizou-se a metodologia de Pascholati et al. (1986). A reação foi obtida a partir da mistura de 500 μL de L-fenilalanina 12 mM em 500 μL de tampão borato de sódio 100mM, pH 8,8, aos quais foram adicionados 400 μL da amostra diluída, perfazendo um volume total de 1,4 mL. Na reação controle foram utilizados os mesmos componentes, sendo suprimido apenas o substrato (L-fenilalanina), o qual foi substituído por igual volume de tampão borato de sódio. Em seguida, as amostras foram incubadas a 40°C por uma hora, sendo a reação paralisada pela adição de ácido clorídrico a 0,5M, após o que se efetuou a leitura em espectrofotômetro a 290 nm. A atividade da enzima foi expressa como atividade específica ($\mu mol.mim^{-1}$.mg proteína $^{-1}$).

A atividade da peroxidases foi quantificada através da medida da absorbância a 470 nm da reação de oxidação do guaiacol, conforme metodologia modificada de Cortelazzo et al. (1996). A mistura da reação consistiu de 40 mM de guaiacol e 20 mM de peróxido de hidrogênio em 40 mM de tampão fosfato de potássio, pH 6,7, sendo adicionados à mistura 100 μL da amostra diluída, resultando em um volume total de 2,5 mL. A atividade da enzima foi expressa em atividade específica (Abs_{470nm}.mg proteína $^{-1}$)

A atividade da enzima β-1-3-glucanase foi quantificada por meio da medida da absorbância (410 nm) dos açúcares redutores (Lever, 1972), após reação de hidrólise de laminarina. Para tanto, misturaram-se 250 μL de laminarina (4 mg/mL do extrato) com 200 μL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0, sendo, em seguida, adicionado 50 μL da amostra diluída, resultando em um volume total da reação de 500 μL. A mistura foi incubada a 50°C por uma hora. Após o período de incubação, retiraram-se alíquotas de 250 μL, as quais foram adicionados 750 μL do reagente de Lever (para 100mL: 1g do ácido *p*-hidroxibenzóico; 20 mL de HCl 0,5 M e 80 mL de NaOH 0,5 M), sendo, em seguida, submetida à fervura por 5 min, procedendo-se, após resfriamento a 25°C, a medida da absorbância a 410 nm. A quantidade de açúcar produzido

foi calculada com base em uma curva padrão de glicose. A atividade da foi expressa em atividade específica (μmol.mim^{-1}.mg proteína $^{-1}$)

A atividade da quitinase foi calculada por método colorimétrico, conforme Inomoto & Yagishita[5], citado por Lertcanawanichakul & Wiwat (2000). O método consistiu da mistura de 100 μL da amostra diluída, 100 μL da solução de glicol quitina (0,01%) e 200 μL de solução tampão de McIlvaine 0,1 M, pH 6,0. Após um período de incubação a 37°C por 15 min, 2 mL de 1,5 mM de uma solução de ferricianeto de potássio foram adicionados. A reação foi terminada submetendo-se em água em ebolição durante 5 min. Após resfriamento a 25°C, foram retiradas alíquotas de 250 μL às quais foram adicionados 750 μL do reagente de Lever (Lever, 1972), sendo analisadas, em seguida, em espectofotômetro a 420 nm. O controle negativo foi obtido misturando-se todos os componentes, exceto o substrato (glicol quitina), cujo volume foi substituído pelo tampão. A atividade da quitinase foi calculada com base em uma curva padrão de N-acetilglucosamina (NAG), obtida a partir de concentrações conhecidas (0-0,015 mg/mL). A atividade específica da enzima foi definida como como a quantidade de enzima capaz de liberar 1μmol/mL de açúcar redutor/minuto/mg de proteina. O branco foi formado pela mistura de todos os componentes, exceto o extrato (enzima).

8.3 Resultados e Discussão

8.3.1 Atividade da fenilalanina amônia-liase

A atividade da FAL está demonstrada na Figura 12, onde pode ser visualizado, por meio da mensuração ao longo do tempo, que houve uma tendência cíclica, presente em todos os tratamentos, a partir de alta atividade inicial desta enzima, seguida por um acentuado declínio, para em seguida

[5] INOMOTO, T.; YAGISHITA, K. A simple activity measurement of isozyme. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.35, p.1154-1156, 1971.

crescer e cair novamente até o final do período de observação. Na comparação entre os tratamentos, observou-se uma alta atividade da enzima nas plantas tratadas com ASM e H_2O (controle), em relação aos demais tratamentos, logo nas primeiras horas após a inoculação (0-6 horas). Este aumento pode estar relacionado ao intenso metabolismo da semente, incitado pelo processo germinativo em curso, onde a atividade da FAL parece ser bastante requisitada (Santos et al., 2004). Vale destacar que as sementes utilizadas no experimento foram submetidas a embebição prévia por 24 horas antes da semeadura e inoculação, cuja condição possibilitou o início do processo germinativo. Dessa forma, a atividade incremental observada pode não estar relacionada exclusivamente à defesa, em que pese a observação de Hahlbrock & Scheel (1989) de que a FAL é induzida em muitas reações de resistência, após tratamento com vários elicitores de reação de defesa.

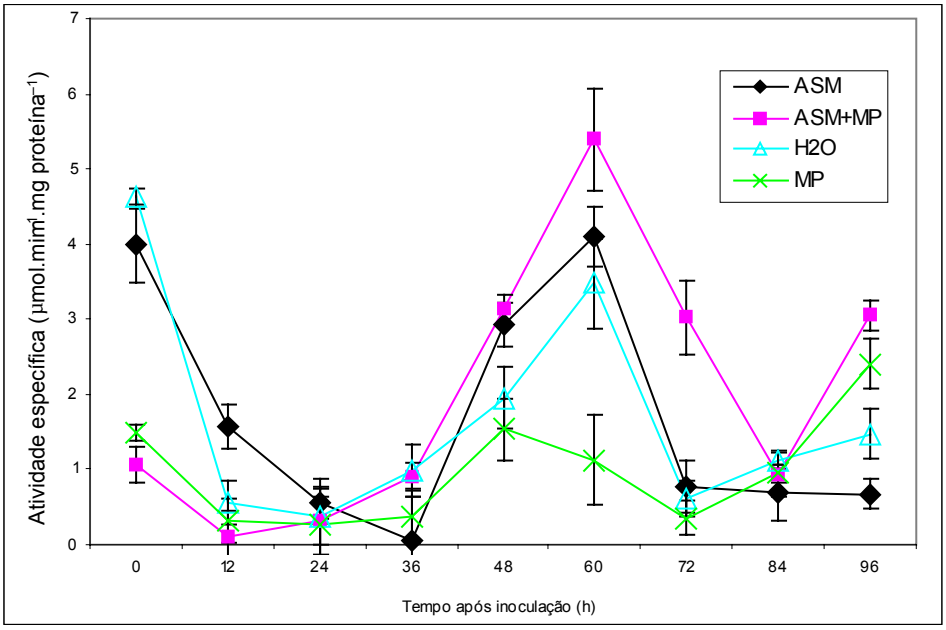

Figura 12 - Atividade da fenilalanina amônia-lyase em sementes e plântulas de caupi cv. Rouxinol tratadas com acibenzolar-S-metil e desafiadas por *M. phaseolina* (ASM= acibenzolar-S-metil, ASM+MP=acienzolar-S-metil+*M. phaseolina*, H2O= testemunha absoluta, MP=*M. phaseolina*)

Analisando-se o curso da atividade da FAL entre os tempos zero e 24 horas após a inoculação, observa-se um menor nível de atividade nos tratamentos inoculados com *M. phaseolina* (ASM+MP e MP). Resultados semelhantes foram destacados por Pascholati et al. (1986), em que os autores não constataram incrementos na atividade da enzima em resposta à inoculação de mesocótilo de milho com fungo incompatível. Assim, em sementes e/ou plântulas de caupi induzidas com ASM, o padrão de alteração na atividade da FAL mostrou-se semelhante ao observado no patossistema caupi-*C. destructivum* (Latunde-Dada & Lucas 2001), em que a atividade da enzima mostrou-se significativamente superior nas plantas induzidas com ASM 18 h após a inoculação, fato observado no presente trabalho, 60 horas após o iníco do tratamento com ASM. Nesse tempo, a atividade observada no tratamento ASM+MP mostrou-se superior aos tratamentos H_2O (controle) e inoculado

(MP). A mesma tendência foi observada entre os tratamentos ASM, H_2O e MP (Figura 12). A atividade observada no tratamento MP isoladamente, parece indicar que o patógeno interage com o hospedeiro, alterando a síntese da enzima e/ou atividade da FAL.

Os dados revelaram também que a atividade da FAL foi alterada nos tratamentos em que houve aplicação do indutor, com ou sem inoculação do patógeno. Esses resultados são discrepantes dos apresentados por Latunde-Dada & Lucas (2001) em que, na ausência do patógeno, os autores não observaram incremento na atividade da enzima. Este comportamento pode estar relacionado, provavelmente à relativa resistência da cultivar Rouxinol a *M. phaseolina* (Capítulo 9), diferentemente do que ocorreu na interação entre *C. destructivum*-caupi, onde a cultivar IT82E60, era altamente suscetível ao patógeno.

8.3.2 Atividade da peroxidases

Constatou-se que, com o passar do tempo, os níveis da atividade da enzima peroxidase foram aumentando gradualmente, com elevação mais intensa a partir das 36 horas após inoculação de forma indistinta em todos os tratamentos. Entretanto, uma maior atividade da enzima foi observada, a partir das 72 e 84 horas, nas plântulas oriundas de sementes tratadas com o ASM+MP e ASM, respectivamente, quando comparada com os tratamentos com o patógeno isoladamente (MP) e com o controle (H_2O) (Figura 13). Este rápido aumento se assemelha, conforme Floot et al. (1997), às respostas típicas de interações incompatíveis. Alterações na atividade da peroxidase, desencadeadas por tratamento com elicitor, têm sido observadas e descritas em plantas de tomate e algodão (Smit & Dubery, 1997), melão (Buzi et al., 2004), cacaueiro (Cavalcanti 2000; Resende et al., 2002), ervilha (Dann & Deverall, 2000), entre outros. No patossistema cacaueiro-*Verticillium dahliae*, Resende et al. (2002) observaram aumento significativo na atividade da enzima, induzido pelo tratamento ASM isoladamente ou em associação com o patógeno (*V. dahliae*), quando comparado com a testemunha absoluta e com o patógeno exclusivamente.

Aumento na atividade da peroxidase também foi observado por Smith et al. (1991) após inocular plantas de pepino com isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Os autores encontraram maiores níveis de atividade da enzima dois dias após a inoculação.

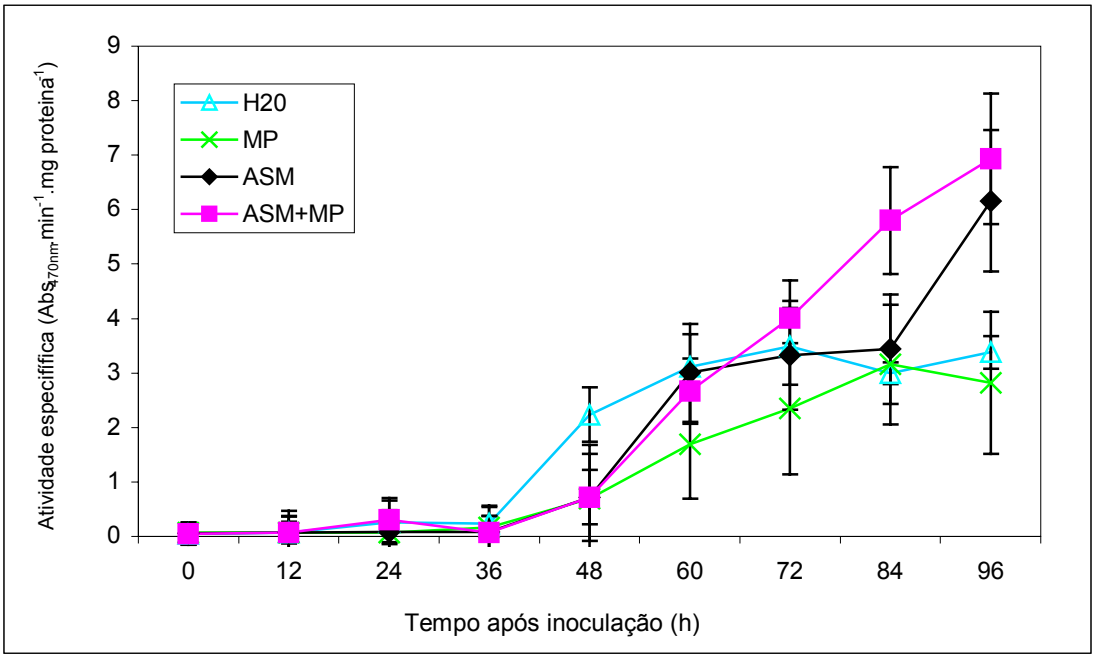

Figura 13 - Atividade de peroxidases em sementes e plântulas de caupi cv. Rouxinol tratadas com acibenzolar-S-metil e desafiadas por *M. phaseolina* (ASM= acibenzolar-S-metil, ASM+MP=acienzolar-S-metil+*M. phaseolina*, H2O= testemunha absoluta, MP=*M. phaseolina*)

Analisando-se os efeitos resultantes da atividade biológica das enzimas FAL e peroxidases, alguns trabalhos têm destacado aumento da síntese de lignina nos tecidos vegetais (Smith & Hammerschimidt 1988; Buchanan et al., 2000; Oliveira et al., 2004). No presente estudo foi observada uma reação cicatricial perceptível no ponto de penetração do fungo, que pode ser relacionada com a síntesee acúmulo de lignina, especialmente nas plantas tratadas com ASM (Figura 14). Reação semelhante, entretanto de menor intensidade, foi observada nos tratamentos que não receberam ASM. Tal fenômeno foi destacado por Resende et al. (2002) para o patossistema cacau-*Crinipelis perniciosa*, onde a lignificação dos tecidos está aparentemente

envolvida na resistência dos tecidos ao ataque do patógeno. Buzi et al (2004) verificaram aumento da resistência em plântulas de melão a *Sclerotinia sclerotiorum* devido a um rápido aumento na atividade da peroxidases, com conseqüente reforço da parede celular, devido à síntese e o acúmulo de lignina nos tecidos.

Figura 14 - Reação cicatricial no hipocótilo de plantas de caupi oriundas de sementes tratadas com acibenzolar-S-metil (25 ppm), aos 22 dias após inoculação.

O fenômeno da lignificação tem sido observado em muitas espécies vegetais, após o início do processo infeccioso causado por fungos, bactérias, vírus e nematóides (Sticher et al., 1997). Existe uma forte evidência que este fenômeno represente um importante mecanismo de resistência aos patógenos (Friend, 1985).

A lignina é uma substância formada pela polimerização de compostos fenólicos produzidos na rota dos fenilpropanóides. O primeiro passo nessa rota consiste na deaminação da fenilalanina para a síntese de ácido cinâmico, catalisada pela FAL. Esta enzima promove a síntese de precursores da lignina e de diversos produtos do metabolismo secundário das plantas, relacionados, também, com os mecanismos de resistência (Sticher et al., 1997). A FAL é induzida em muitas reações de resistência e após tratamento com vários elicitores de reação de defesa (Hahlbrock & Scheel, 1989). Conforme os autores, outras enzimas presentes também na rota dos fenilpropanóides, a exemplo da cinamil álcool deidrogenase, 4-coumarato:Coa ligase e peroxidases são um indicativo de lignificação e podem estar envolvidas nas respostas de resistência.

8.3.3 Atividade da quitinase

A atividade da enzima quitinase mostrou-se efetivamente aumentada nos tratamentos com ASM, quer com o produto em associação com patógeno (ASM+MP) ou isoladamente (ASM), sobretudo nos tempos de 36 e 60 horas, após a inoculação, respectivamente, onde foram observados picos de elevada atividade da enzima (Figura 15). Os dados revelaram, também, que o comportamento de todos os tratamentos, exceto H_2O, mostrou-se bastante variável ao longo do tempo, o qual foi marcado por picos de alta e baixa atividade da enzima.

A expressão da resistência levada a efeito pela aplicação de ASM se deve conforme Busi et al. (2004) ao incremento da atividade da enzima quitinase, a qual, por uma ação direta, hidrolisa a quitina presente na parede celular dos fungos. Estes autores observaram significativa elevação da atividade da quitinase, explicando, dessa forma, seu efeito no controle de *Didymella bryoniae* e *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de melão, após aplicação de ASM nas sementes. Além da ação direta da enzima sobre a parede celular dos patógenos, seu efeito pode ser potencializado pela ativação de outros mecanismos de defesa devido à liberação de oligômeros da parede celular microbiana (Milosevic & Slurenko, 1996).

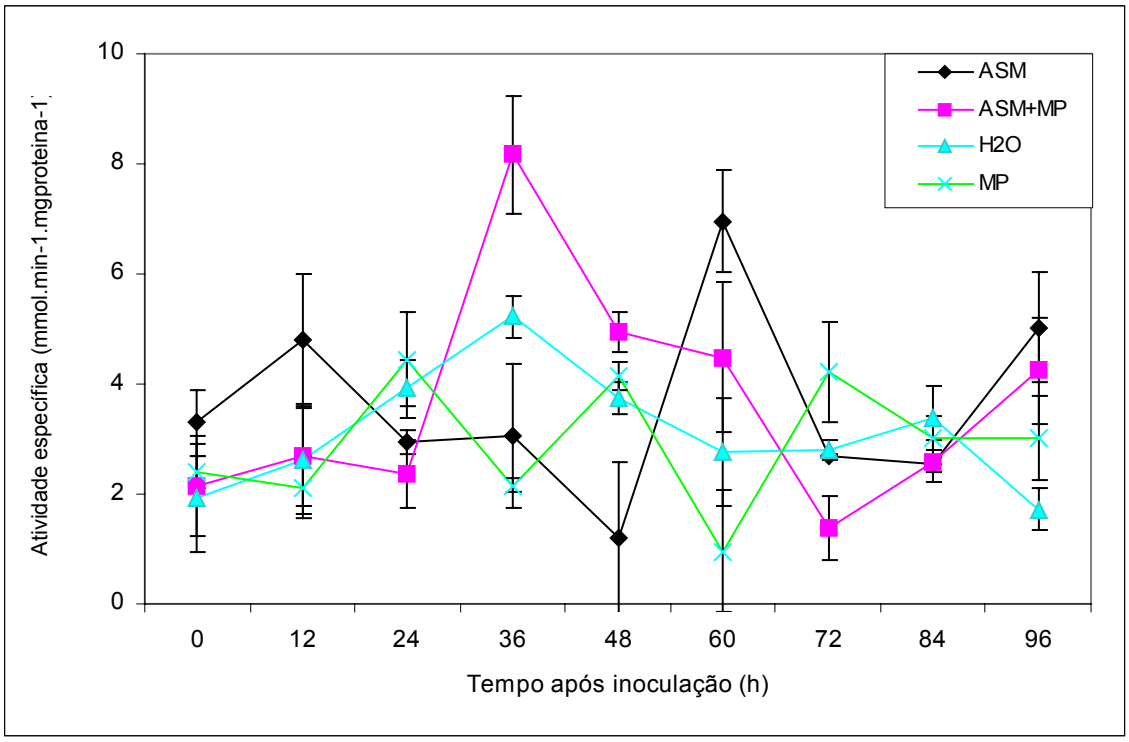

Figura 15 - Atividade de quitinase em sementes e plântulas de caupi cv. Rouxinol tratadas com ASM e desafiadas por *M. phaseolina* (ASM= acibenzolar-S-metil, ASM+MP=acienzolar-S-metil+*M. phaseolina*, H2O= testemunha absoluta, MP=*M. phaseolina*)

Vale destacar, no entanto, a presença de atividade da enzima, em maiores ou menores níveis em todos os tratamentos, inclusive na testemunha absoluta (H_2O). Isso pode explicar, em parte, a resistência intermediária da cultivar Rouxinol, a *M. phaseolina* (Capítulo 9). A presença de quitinase em sementes de caupi, em condições naturais, foi destacada por Gomes et al. (1996), indicando que a enzima faz parte de uma rede natural de defesa pré-existente. Tal mecanismo parece estar, também, associado com a resistência de cevada a *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* (Ignatius et al., 1994) e trigo a *Puccinia triticina* (Anguelova-Merhar et al., 2002)

8.3.4 Atividade de ß-1,3-glucanase

A atividade da enzima ß-1-3-glucanase ao longo do tempo apresentou, nos diferentes tratamentos estudados, um padrão similar de comportamento (Figura 16). Resultado semelhante foi verificado por Petruzzelli et al. (1999) ao avaliarem a expressão da atividade da enzima durante a fase de germinação e desenvolvimento de plântulas. Todavia, observou-se, entre os tempos de 12 e 24 horas após a inoculação, um expressivo aumento da atividade da enzima no tratamento MP (patógeno isoladamente), cujo valor de atividade mostrou-se 2,6 vezes superior ao observado para testemunha absoluta (H_2O). Nos demais tempos houve uma tendência a um discreto crescimento da atividade da enzima, entretanto sem revelar grandes diferenças entre os tratamentos estudados.

Semelhante ao observado para quitinase, os resultados indicaram uma expressiva atividade basal da enzima presente nas sementes e/ou plântulas, o que pode ser confirmado pelo significativo aumento de atividade verificado entre os tempos zero e 24 horas após inoculação no tratamento testemunha (H_2O). Estes resultados estão de acordo com os de Gomes et al. (1996), ao verificarem a existência de atividade da ß-1,3-glucanase em sementes de caupi

em condições naturais, sem que existam outros estímulos, senão aqueles resultantes do processo germinativo.

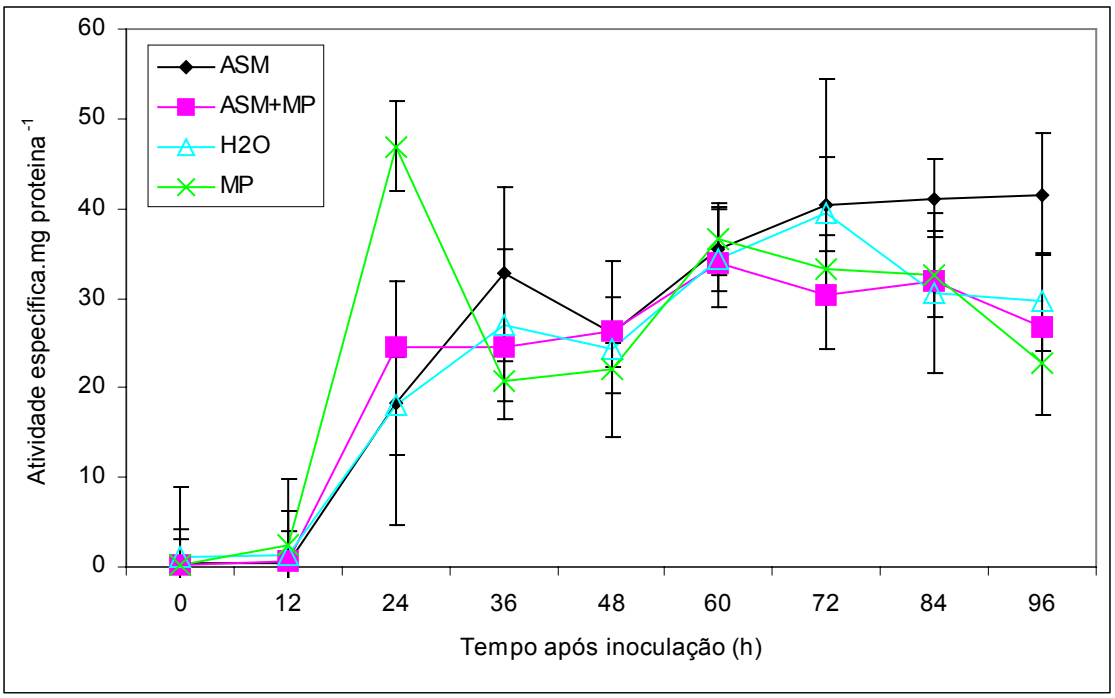

Figura 16 - Atividade de ß-1-3-glucanase em sementes e plântulas de caupi cv. Rouxinol tratadas com ASM e desafiadas por *M. phaseolina* (ASM= acibenzolar-S-metil, ASM+MP=acienzolar-S-metil+*M. phaseolina*, H2O= testemunha absoluta, MP=*M. phaseolina*)

Em plântulas de ervilha, Wong & Maclachlan (1980) verificaram presença de glucanase, tanto na região meristemática quanto na área basal das plantas, e associaram tal ocorrência a uma função desvinculada das reações de defesa, de crescimento e nutrição, mas relacionada com a manutenção do fluxo de solutos ao longo da parede celular, potencializando a rota de transporte lateral e a comunicação através dos plasmodesmata. Petruzzelli et al. (1999) encontraram altas concentrações de ß-1-3-glucanase em embriões de *Pisum*

sativum. Nesta linha, Leubner-Metzger (2003) destaca que, além de atuar mediando reações de defesa, a enzima desempenha importante função na regulação do processo germinativo e na dormência das sementes. A existência, por exemplo, de uma fina camada de ß-1-3-glucana, envolvendo as sementes, dificulta a germinação, a qual é facilmente degradada pela ação da glucanase, viabilizado a germinação das sementes. Os resultados apresentados por estes autores respaldam as informações do presente trabalho, quando demonstram, para outras espécies, a atividade de ß-1-3-glucanase, desvinculada da presença de patógenos. O aumento na atividade da referida enzima, verificado neste trabalho, pode ser explicado, também, à semelhança do discutido para a quitinase, pela relativa resistência mostrada pela cultivar Rouxinol (Capítulo 9). Neste aspecto, recentes trabalhos têm destacado que ambas enzimas atuam em conjunto, auxiliando as plantas na defesa contra os fitopatógenos (Leubner-Metzger & Meins, 1999). Os autores mostraram que o mecanismo de ação dessas enzimas é expresso de duas formas: diretamente, degradando a parede celular do patógeno; e, indiretamente promovendo a liberação de materiais derivados da parede celular que podem atuar como elicitores de reações de defesa.

8.4 Conclusões

1. O acibenzolar-S-metil, quando aplicado nas sementes de caupi, alterou a atividade das enzimas FAL, peroxidase e quitinase, não sendo observada alteração na atividade de ß-1,3-glucanase.

2. De uma maneira geral, a atividade das enzimas FAL, peroxidase e quitinase foi sempre menor no tecido inoculado com o fitopatógeno *M. phaseolina,* quando comparado com tecido tratado com ASM

3. As alterações nas atividades das enzimas estão relacionadas aos mecanismos de defesa e/ou a espectos relativos ao crescimento e nutrição dos tecidos vegetais

9 REAÇÃO DE CULTIVARES DE CAUPI A *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.

Resumo

No presente trabalho foi avaliado o comportamento de cultivares brasileiros de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] Maratauã, Rouxinol, Mulato, Vagem Roxa, Epace 10, BR 7 – Parnaíba, BR 17 – Gurguéia, IPA 206, Vita 7, Tracuateua, Guariba e Setentão inoculados com *Macrophomina phaseolina* , sob condições de casa de vegetação. Foi observada variabilidade genética em caupi quanto a resistência a *M. phaseolina.* A maioria dos genótipos avaliados apresentou reação do tipo resistência intermediária contra o patógeno, tendo as cultivares BR-14 Mulato, Guariba, Maratauã e Rouxinol se destacado pelos altos níveis de resistência apresentados.

Behavior of cowpea cultivars to *macrophomina phaseolina*

Summary

The behavior of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cultivars Maratauã, Rouxinol, Mulato, Vagem Roxa, Epace 10, BR 7 – Parnaíba, BR 17 – Gurguéia, IPA 206, Vita 7, Tracuateua, Guariba and Setentão, inoculated with *Macrophomina phaseolina*, causal agent of charcoal rot, was evaluated under greenhouse condition. The cowpea cultivars compared had an intermediate

level of resistance to the pathogen, but BR-14 Mulato, Guariba, Maratauã and Rouxinol genotypes were the most resistant to the pathogen.

9.1 Introdução

O caupi [*Vigna unguiculata*(L.) Walp.], espécie bastante cultivada nas Regiões Nordeste e Norte do Brasil, constitui um importante componente alimentar às populações rural e urbana, além de viabilizar uma atividade geradora de emprego e renda para as famílias de pequenos agricultores (Araújo, 1988; Frota & Pereira, 2000).

Dados do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (2002) indicam um rendimento médio de 332 kg/ha. Tal valor é muito pequeno, quando comparado com o potencial da espécie, que é de aproximadamente 2500kg/ha (Cardoso et al., 1995; Freire Filho et al., 1997; Cardoso, 2000). Conforme Rios (1988), um dos principais fatores determinantes desse resultado é a ocorrência de doenças.

A espécie é afetada por inúmeros patógenos, cujas doenças têm contribuído para os baixos rendimentos da cultura. Dentre os patógenos fúngicos destaca-se *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., agente causal da podridão cinzenta do caule (Pastor-Corrales & Abawi, 1988; Rios, 1988; Abawi & Pastor-Corrales, 1990; Ponte, 1996).

Em que pese tratar-se de doença séria, sobretudo em áreas sujeitas a altas temperaturas e solos com baixa umidade (Pio-Ribeiro & Assis Filho, 1995; Rodrigues et al., 1997), seu controle vem sendo totalmente negligenciado. Tal fato é conseqüência do baixo padrão tecnológico dos pequenos agricultores, principais beneficiários do cultivo do caupi.

Diante dessa realidade, o controle da doença pode ser idealmente viabilizado por meio do emprego de cultivares resistentes (Zimmer & Hoes, 1978; Araújo, 1988), cuja tecnologia pode ser repassada pelo cultivo de

genótipos melhorados, portando genes de resistência aos principais patógenos, especialmente ao agente da podridão cinzenta do caule.

Conforme Kimati & Bergamin Filho (1995) e Camargo & Bergamin Filho (1995), o emprego de cultivares resistentes constitui uma das mais importantes medidas a serem incorporadas ao manejo das doenças, por ser a medida mais econômica e passível de integração com outros métodos de controle.

Em muitas espécies de importância econômica têm sido identificadas fontes de resistência a *M. phaseolina*, a exemplo do que ocorreu com feijoeiro (Malavolta Júnior et al., 1982; Issa 1985; Echavez-Badel & Beaver, 1987, Panizzi, 1988; Pastor-Corrales & Abawi, 1988; Aires et al.,1994; Cardoso, 1994; Coelho Neto & Dhingra, 1996; Perez, 1998; Maringoni & Lauretti, 1999; Mayek-Perez et al., 2001), cuja herança da resistência é conferida por dois genes complementares dominantes (Olaya & Abawi, 1996), girassol (Lopes & Kimati 1988a; Lopes & Kimati, 1988b) e juta (De & Kaiser 1991).

Neste aspecto, Maringoni & Lauretti (1999) destacam que, para a obtenção de cultivares de feijoeiro resistentes a *M. phaseolina*, faz-se necessário o conhecimento do padrão de resistência presente nos diferentes genótipos a serem empregados como progenitores doadores de resistência nos cruzamentos com genótipos superiores.

Relativamente à cultura do caupi, os trabalhos relacionados à fontes de resistência genética a *M phaseolina* são escassos. Entretanto, vale destacar os de Rodrigues et al. (1997), bem como a citação de Pio-Ribeiro & Assis Filho (1997), os quais enfatizam a existência de variabilidade no comportamento de alguns genótipos à podridão cinzenta do caule, com indicação clara de fontes de resistência ao patógeno.

Assim, o presente trabalho objetivou verificar a existência de variabilidade na reação de germoplasma de caupi a *M. phaseolina*, bem como identificar genótipos resistentes ao patógeno, que sirvam como progenitores em programa de melhoramento genético.

9.2 Material e Métodos

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação, na área experimental do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia agrícola da ESALQ/USP, em Piracicaba, SP.

Foram comparadas as cultivares de caupi Maratauã, Rouxinol, Mulato, Vagem Roxa, Epace 10, BR 7 – Parnaíba, BR 17 – Gurguéia, IPA 206, Vita 7, Tracuateua, Guariba e Setentão, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI, cujas sementes foram previamente submetidas ao teste de sanidade, onde foi constatada a ausência de *M. phaseolina.*

Empregou-se o isolado de *M. phaseolina* MP 103, obtido de sementes de caupi cv. Paulistinha (amostra originária de Teresina-PI) e pertencente à coleção de fungos do Laboratório de Patologia de Sementes da ESALQ/USP. Para obtenção do inóculo, fragmentos de micélio fúngico foram transferidos para placas de Petri com meio BDA. As culturas foram incubadas em condições controladas de temperatura (25ºC) e luminosidade (fotofase de 12 horas de luz branca fluorescente/12 h escuro), durante cinco dias. Após o período de incubação, efetuou-se o preparo do inóculo, adicionando-se três discos de meio BDA com a colônia fúngica (5 mm Ø) em erlenmeyer contendo sementes de arroz em casca, previamente esterilizadas em autoclave (1g de sementes de arroz/1mL de água) (Abawi & Pastor-Corrales, 1990). Após a deposição dos discos, o substrato foi mantido em condições controladas de temperatura (25ºC) e luminosidade (fotofase de 12 horas de luz branca fluorescente/12 h escuro), durante 15 dias, até a completa colonização dos grãos de arroz pelo patógeno.

O método de inoculação utilizado consistiu da deposição de quatro grãos de arroz colonizados sobre as sementes, imediatamente após a semeadura e posterior cobertura com uma fina camada de solo estéril (Abawi & Pastor-Corrales, 1990).

A parcela experimental constou de uma caixa plástica de 45 cm X 35 cm X 10 cm (comprimento, largura e altura), contendo oito litros de solo esterilizado, nas quais foram distribuídas 20 sementes, previamente embebidas em água esterilizada, por cinco horas. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, onde foram coletados os dados de umidade relativa e temperaturas mínima, máxima e média. Foi adotado o delineamento experimental em blocos ao acaso, com 12 tratamentos (genótipos) e quatro repetições, totalizando 80 sementes/tratamento.

A reação dos genótipos a *M. phaseolina* foi avaliada através da determinação da percentagem de plantas sadias (sem sintomas aparentes), aos dez dias, e da severidade média da doença, aos 15 dias. Avaliou-se a severidade por meio de uma escala diagramática adaptada de Abawi & Pastor-Corrales (1990), com notas variando de 1 a 9, onde 1=plantas sem sintomas, 3=lesões limitadas ao cotilédone, 5=lesões cobrindo o cotilédone e aproximadamente 2 cm do hipocótilo, 7=lesões grandes, cobrindo todo o hipocótilo e base do pecíolo das folhas primárias e 9=todo caule, pecíolo e gema atacados.

Com base nos resultados de emergência de plantas sadias, definiu-se a reação dos genótipos, conforme o seguinte critério: suscetível (0-25% sadias), intermediário (25,1-60% plantas sadias) e resistente (60,1-100% plantas sadias). Para a severidade, a reação dos genótipos foi definida conforme os intervalos de notas: resistente (1 a 3), intermediário (3,1 a 5) e suscetível (5,1 a 9).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com auxílio do procedimento PROC ANAVA do SAS (SAS Institute Inc. 1992).

9.3 Resultados e Discussão

Os dados de clima (umidade relativa máxima e mínima e temperatura máxima e mínima), observados durante a execução do experimento, em campo, estão representados nas Figuras 17, 18, 19 e 20 (Anexo).

Analisando-se os dados referentes à emergência de plantas sadias (Tabela 9), observa-se que as cultivares de caupi comparadas apresentaram diferentes graus de resistência à *M. phaseolina*.

Tabela 9. Comportamento de cultivares de caupi inoculados com *M. phaseolina*, sob condições de casa de vegetação[1]

Cultivares	Plantas sadias (%)	Reação
Maratauã	71,6 a	R
Rouxinol	61,5 ab	R
Mulato	57,3 abc	I
Vagem roxa	54,3 abc	I
Epace 10	45,8 abc	I
BR 7 – Parnaíba	44,4 abc	I
BR 17 – Gurguéia	31,5 abc	I
IPA 206	28,4 abc	I
Vita 7	25,3 abc	I
Tracuateua	16,3 bc	S
Guariba	15,6 bc	S
Setentão	11,2 c	S
C.V. (%)	49,7	-
DMS	47,7	-

[1] Média de quatro repetições. [2] Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

A reação das cultivares suscetíveis foi bastante evidente logo na primeira semana de condução do experimento. A primeira indicação desse caráter foi a baixa emergência das cultivares mais suscetíveis, tais como o observado para os cv. Setentão e Tracuateua, cuja percentagem total de emergência foi 48% e 52%, respectivamente (dados não apresentados). Esse comportamento foi motivado pela morte de sementes e plântulas em

decorrência do ataque do patógeno. Além disso, observou-se, nos cotilédones das plantas emergentes, a presença de lesões necróticas de aspecto escuro. Tais lesões expandiram-se rapidamente sobre os tecidos do caule, resultando na morte das plantas suscetíveis em aproximadamente uma semana. Resultados semelhantes foram relatados em outros trabalhos envolvendo o patossistema feijão e *M. phaseolina* (Gangopadhyay & Wyllie, 1973; Pastor-Corrales & Abawi, 1988). A análise desse parâmetro permitiu discriminar os cvs. Maratauã e Rouxinol como resistentes, com valores de percentagem de emergência de plantas sadias de 71,6% e 61,5%, respectivamente. Tracuateua, Guariba e Setentão apresentaram reação de suscetibilidade. Os demais genótipos mostraram reação intermediária à doença (Tabela 9).

Os resultados referentes à severidade, bem como à reação dos genótipos à podridão cinzenta do caule, encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10. Comportamento de genótipos de caupi inoculados com *M. phaseolina*, sob condições de casa de vegetação[1]

Cultivares	Severidade[2]	Reação
Mulato	2,1 c	R
Maratauã	3,0 bc	R
Guariba	3,0 bc	R
BR 7 Parnaíba	3,1 abc	I
Vita 7	3,1 abc	I
Rouxinol	3,3 abc	I
Epace 10	3,4 abc	I
Vagem roxa	3,5 abc	I
IPA 206	4,1 abc	I
BR 17 – Gurquéia	4,4 abc	I
BR 1 Tracuateua	5,5 ab	S
Setentão	5,9 a	S
C.V. (%)	30,56	-
DMS	2,8	-

[1] Média de quatro repetições [2] Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste e Tukey a 5% de probabilidade

Observou-se que a maioria das cultivares de caupi apresentou comportamento situado entre resistente (R) e intermediário (I). As cvs BR-14 Mulato, Guariba e Maratauã comportaram-se como resistentes, enquanto Setentão e Tracuateua mostraram-se susceptíveis, confirmando, dessa forma, os dados observados na avaliação de percentagem de emergência de plantas sadias, exceto para a cv. Guariba que se mostrou suscetível (Tabela 9).

A presença de reação do tipo resistência (R) e intermediária (I), verificada na maioria das cultivares avaliadas, pode ser explicada pela seleção desses genótipos na presença da doença. Observação inversa foi verificada no patossistema feijão e *M. phaseolina* por Maringoni & Lauretti (1999). Nesse patossistema, os autores encontraram suscetibilidade na maioria dos genótipos avaliados e concluíram que esta reação dos genótipos estudados poderia estar relacionada à ausência do patógeno durante as fases do melhoramento genético (ausência de pressão de seleção).

Os resultados obtidos mostram que a maioria dos genótipos comparados, exceto os cvs. Setentão (Paiva et al., 1988), Tracuateua, IPA 206 e Epace 10, foram desenvolvidos nas condições ambientais do Estado do Piauí (Freire Filho et al., 1997; Cardoso et al.,1990), local de origem do isolado do fungo empregado neste trabalho. Assim, provavelmente, os referidos genótipos tenham sido selecionados indiretamente para característica de resistência a *M. phaseolina*.

Confrontando-se os dados relativos à emergência de plantas sadias (Tabela 9) e severidade (Tabela 10), observou-se diferença no tocante a reação da cv. Guariba. Em termos de severidade, esta cultivar foi classificada como resistente (R), sendo considerada suscetível (S) pelo parâmetro percentagem de emergência de plantas sadias. Tal comportamento pode ser conseqüência do padrão de resistência manifestada por este genótipo, cujas plantas permitem o estabelecimento inicial das relações patógeno-hospedeiro, com posterior bloqueio do progresso da infecção. Nestes genótipos, os níveis de severidade são normalmente baixos, porquanto as lesões mostram-se

pequenas e superficiais. Comportamento semelhante ao manifestado é bastante desejável, pois provavelmente resulte da expressão de mais de um gene, o que pode conferir uma maior estabilidade à resistência (Vanderplanck, 1978). Do ponto de vista da reação apresentada frente a *M. phaseolina*, considera-se a cv. Guariba como adequada ao cultivo, uma vez que se constitui em uma das poucas opções de fontes de resistência dentre os genótipos de tegumento branco.

Em trabalhos desenvolvidos por Rodrigues et al. (1997) constatou-se que os genótipos Epace 10, CNCx-377 e Moitinha, entre outros, apresentaram reação de resistência à *M. phaseolina*. Por outro lado, genótipos como IPA 206 e BR-17 Gurguéia foram classificados como, respectivamente, suscetível e altamente suscetível. Estes resultados não estão de acordo com os obtidos neste trabalho, onde essas duas cultivares apresentaram níveis intermediários de resistência (Tabelas 9 e 10). Tal diferença pode ser, em parte, explicada pela variabilidade patogênica, provavelmente existente entre os isolados utilizados nos dois experimentos (Rodrigues et al., 1997a; Perez, 1998).

Perez (1998), estudando o patossistema feijão *versus M. phaseolina*, identificou reação diferencial entre isolados e cultivares, chegando, inclusive, a especular a possibilidade de existência de especialização patogênica ao nível de raça fisiológica, em função da grande variabilidade encontrada.

Os resultados obtidos confirmam a existência de variabilidade no patossistema estudado, possibilitando a discriminação de cultivares resistentes e de outros intermediários, prováveis doadores de genes de resistência. Todavia, faz-se necessário a realização de testes em campo considerando diferentes épocas e regiões produtoras, de forma a respaldar a ampla utilização dessas cultivares no sistema produtivo do caupi. Relativamente a isto, Dhingra & Sinclair (1978) e Mayek-Perez et al. (2001) demonstraram que a interação entre hospedeiro e patógeno está sujeita a interferência direta do ambiente com reflexos na expressão da resistência.

9.4 Conclusões

1. Foi observada ampla variação quanto a reação dos genótipos de caupi contra *M. phaseolina*
2. A maioria das cultivares avaliadas apresentou resistência intermediária contra o patógeno, tendo as cvs BR-14 Mulato, Guariba, Maratauã e Rouxinol apresentado reação tipo resistência ao agente da podridão cinzenta do caule.
3. Os genótipos Setentão e Tracuateua mostraram-se suscetíveis a *M. phaseolina*.

10 CONCLUSÕES GERAIS

1. A metodologia de detecção de patógenos em sementes, através do método do papel de filtro, empregando restrição hídrica com NaCl a –0,8MPa, mostrou-se um método alternativo adequado para detecção de fungos presentes nas sementes de caupi, especialmente *M. phaseolina*.

2. A análise sanitária das amostras de sementes de caupi, originárias de sete estados brasileiros, revelou a presença do fungo *M. phaseolina* em 62% delas. Os maiores níveis de incidência média do patógeno foram detectados nas amostras provenientes dos Estados da Paraíba (20,4 %), Pará (8,16%) Piauí (6,84%) e Bahia (6,13%), sendo que o menor nível encontrado foi para amostras procedentes do Estado do Ceará (0,17%).

3. Sementes de caupi com tegumento branco apresentaram maior incidência de *M. phaseolina* (9%), quando comparadas com as de tegumento marrom (3%) e creme (1%).

4. Isolados de *M. phaseolina* recalcitrantes em esporularem em meio artificial mostraram-se esporulantes quando, ao meio de cultura BDA, foram adicionadas discos de folhas de trigo, sendo os melhores níveis de esporulação obtidos quando essa condição foi combinada com temperatura de 25°C.

5. O fungo *M. phaseolina* foi eficientemente controlado pela aplicação, via sementes, de 25 ppm de acibenzolar-S-metil (ASM).

6. Acibenzolar-S-metil,quando aplicado nas sementes de caupi, alterou a atividade das enzimas FAL, peroxidase e quitinase, não sendo observada alteração na atividade de ß -1,3-glucanase.

7. De uma maneira geral, a atividade das enzimas FAL, peroxidase e quitinase foi sempre menor no tecido inoculado com o fitopatógeno *M. phaseolina,* quando comparado com tecido tratado com ASM

8. Resistência genética a *M. phaseolina* foi manifestada pelas cultivares Mulato, Guariba e Maratauã. Os genótipos Setentão e Tracuateua mostraram-se susceptíveis ao patógeno.

ANEXOS

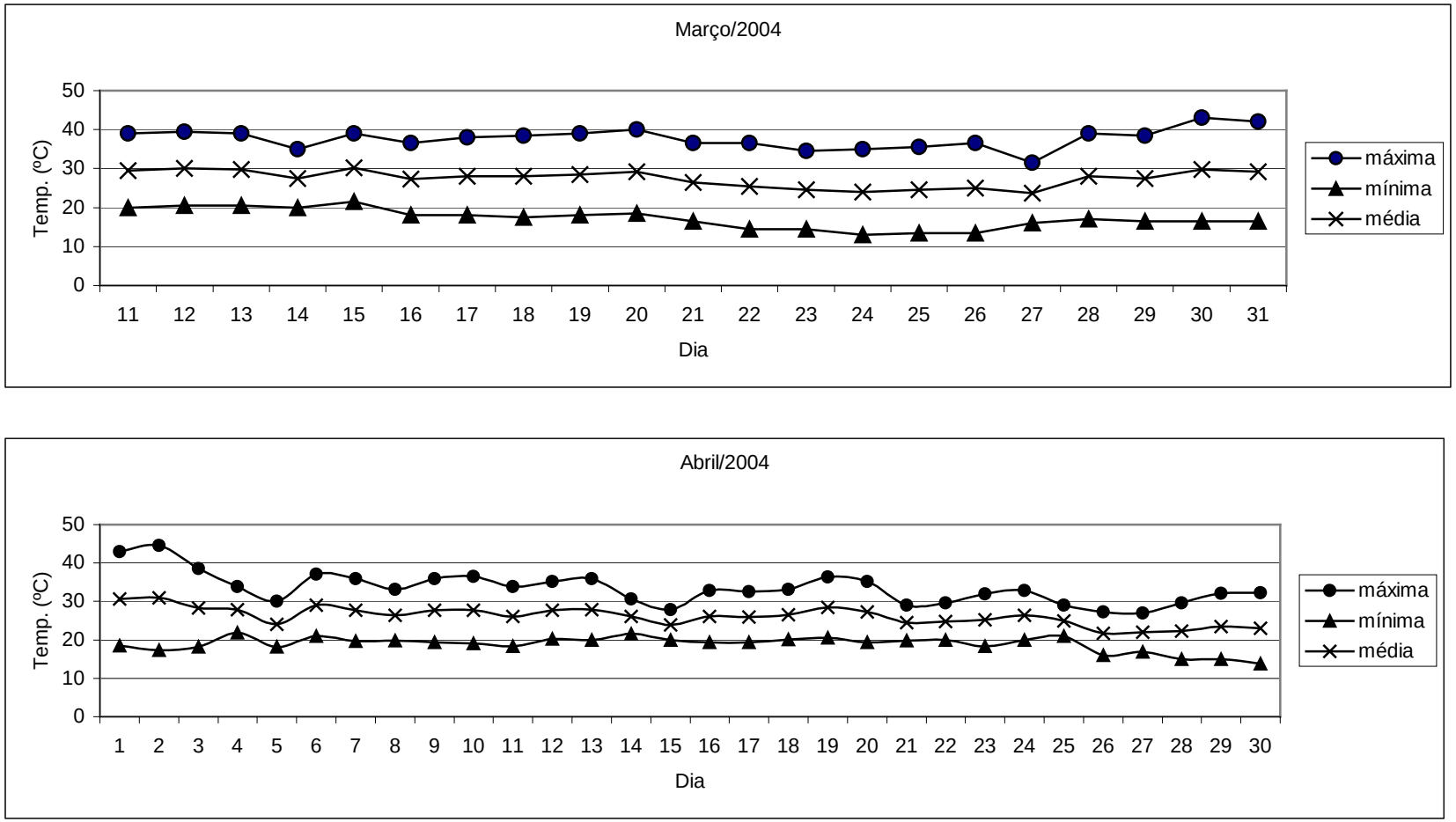

Figura 17 - Temperaturas máxima, média e mínima obtidas nos meses de março-abril na casa de vegetação, campo experimental ESALQ/USP. Piracicaba, 2004.

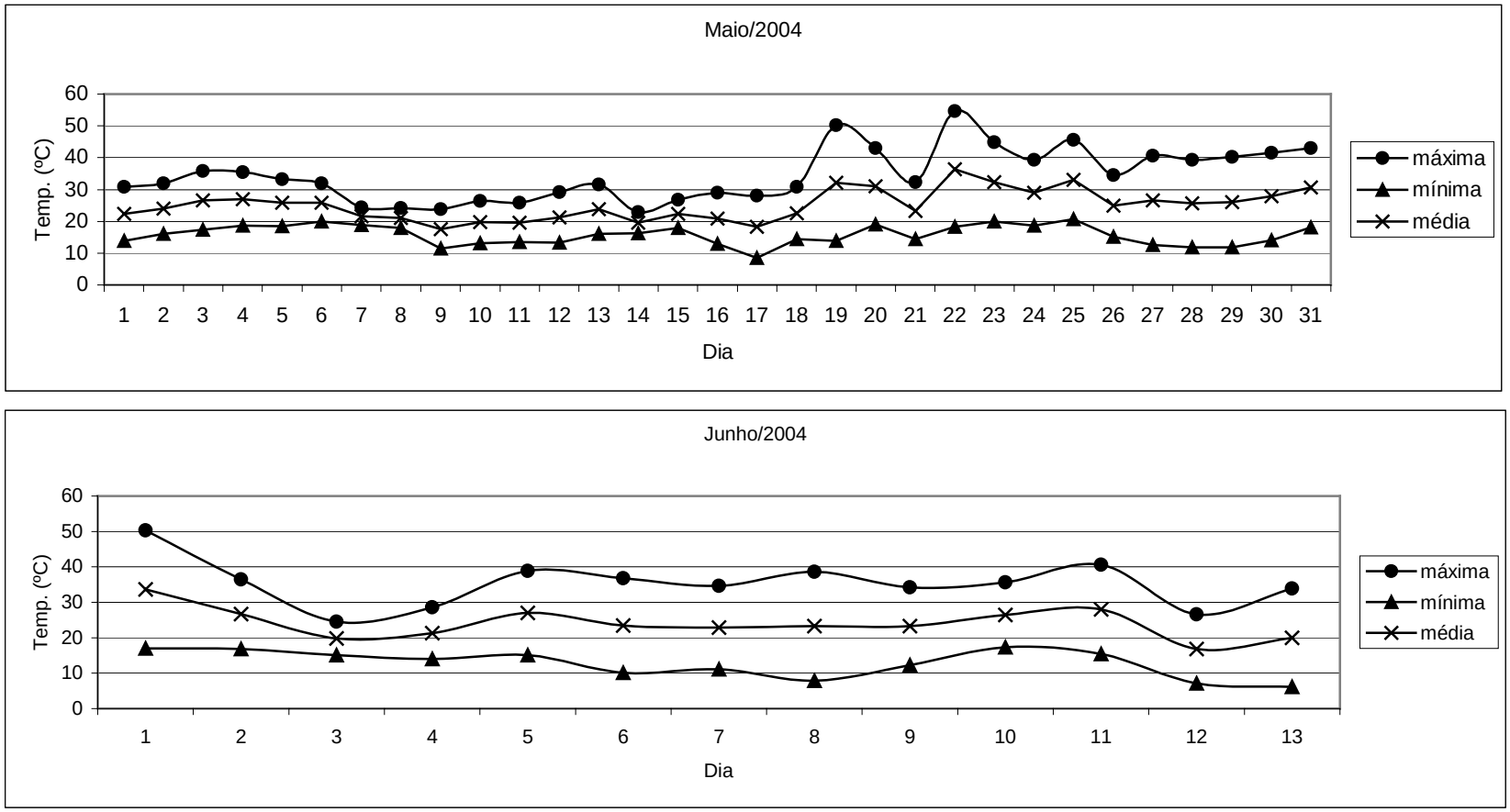

Figura 18 - Temperaturas máxima, média e mínima obtidas nos meses de maio-junho na casa de vegetação, campo experimental ESALQ/USP. Piracicaba, 2004.

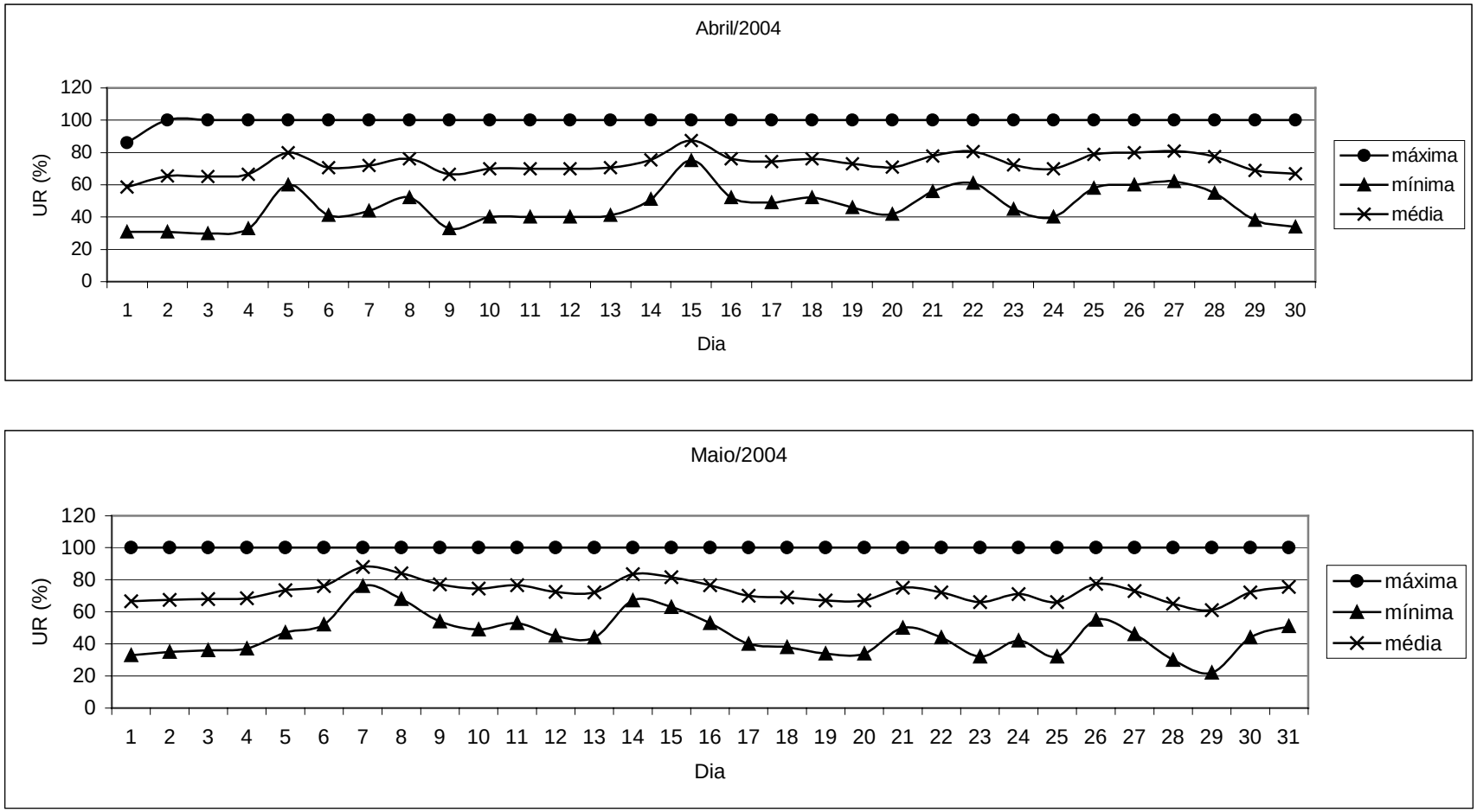

Figura 19 - Umidade relativa-UR (%) máxima, média e mínima obtidas nos meses de abril-maio na casa de vegetação, campo experimental ESALQ/USP. Piracicaba, 2004.

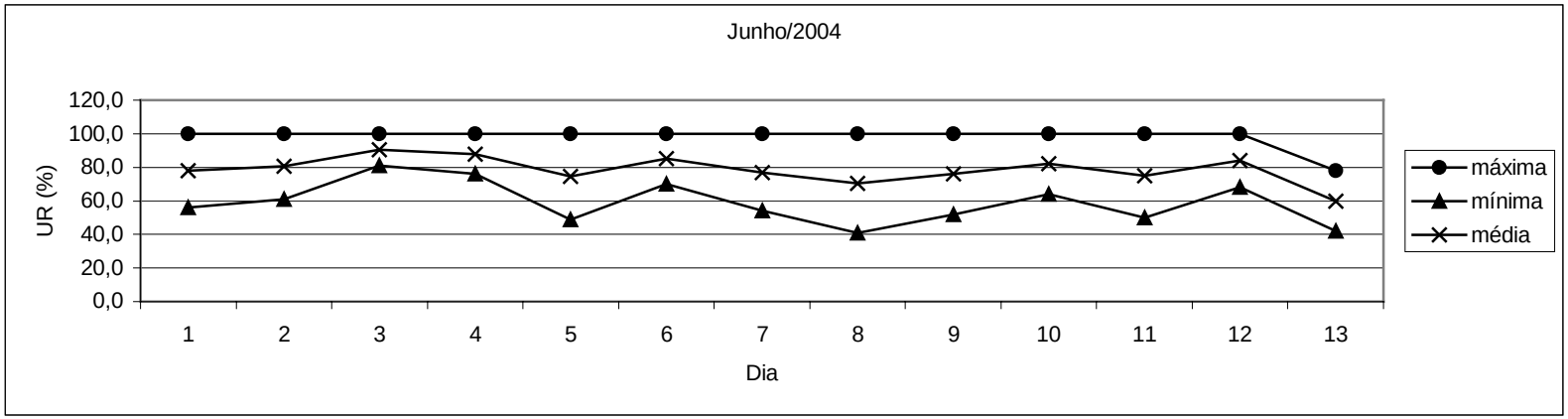

Figura 20 - Umidade relativa-UR (%) máxima, média e mínima obtidas no mês de junho na casa de vegetação, campo experimental ESALQ/USP. Piracicaba, 2004.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAWI, G.S.; PASTOR-CORRALES, M.A. **Root rots of bean in Latin America and Africa**: diagnosis, research metodologies and management strategies. Bogotá: Centro de Agricultura Tropical, 1990. 114p.

ABDELMONEM, A.M. Status of seed pathology and seed health testing in Egypt. **Seed Science and Technology**, v.28, p.533-547, 2000.

AIRES, S.S.B.; DEL PELOSO, M.J.; CARDOSO, J.E. Avaliação de genótipos de feijão a dezenove isolados de *Macrophomina phaseolina* em condições de casa-de-vegetação. In. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Arroz e Feijão. **Relatório técnico 1990/1992**. Goiânia, 1994. p. 150-151.

ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F.V.; HENNING, A.A. Doenças da soja (*Glycine Max* L.). In: In: KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; RESENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 3ed. São Paulo: Ceres, 1997. v.2, p.642-664.

ALVES, C.A.; GRAVENA, J.C.; MORAES, M.H.D.; ATHAYDE SOBRINHO, C.; DEZORDI, C.; MENTEN, J.O.M. Restrição hídrica como alternativa ao congelamento no método do papel de filtro para detecção de de patógenos em sementes de soja. In; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMNTES, 7., 2002, Sete Lagoas. **Resumos e palestras**. Sete Lagoas:Embrapa Milho e Sorgo, 2002. p.89.

ANDRUS, C.F. Seed transmission of *Macrophomina phaseoli*. **Phytopathology**, v.28, p.620-643,1938.

ANFOKA, G.H. Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill vc. Vollendung) to Cucumber Mosaic Virus. **Crop Protection,** v.19, p.401-405, 2000.

ANGUELOVA-MERHAR, V.S.; VAN DER WESTHUIZEN, A.J.; PRETORIUS, Z.A. Intercellular chitinase and peroxidase activities associated with resistance conferred by gene *Lr35* to the leaf rust of wheat. **Journal of Plant Physiology**, v.159, p.1259-1261, 2002.

ANSELME, C. Importance em culture des organismes pathogenes transmis por lês semences. **Seed Science and Technology**, v.9, p.689-695, 1981.

ARAÚJO, E. Diagnóstico da patologia de sementes de caupi: *Vigna unguiculata* (L.) Walp. , no Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, v.7, p.91-103, 1985.

ARAÚJO, E.; DORNELAS, G.V.; LIMA, A.A.; BRUNO, R.L.A. OLIVEIRA FILHO, J.J. Avaliação das qualidades sanitárias e fisiológicas das sementes usadas para plantio no Estado da Paraíba. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 3., Campinas, SP. 1983. **Resumos**. Campinas: ABRATES, 1983. p. 76.

ARAÚJO, E.; ROSSETO, E. A. Doenças e injúrias em sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V. (Ed.). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.146-163.

ARAÚJO, J.P.P. O melhoramento do caupi no Brasil. In: ARAÚJO, J.P.P.; WATT, E.E. (Org.). **O caupi no Brasil**. Brasília: IITA, EMBRAPA, 1988. p.252-283.

ARAÚJO, J.P.P.; WATT, E.E. **O caupi no Brasil**. Brasília: IITA, EMBRAPA,1988. 722p.

ASHWORTH, L. J. Environmental and inherents factors the influence sporulation of *Macrophomina phaseolina*. **Phytopathology**, v.49, p.533-556, 1959.

ATHAYDE SOBRINHO, C.;VIANA, F.M.P.; SANTOS, A.A. Doenças do feijão caupi. In: CARDOSO, M.J. (Org.). **A cultura do feijão caupi no Meio-Norte do Brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2000. p.120-145.

ATHAYDE SOBRINHO, C.; DEZORDI, C.; MORAES, M.H.D.; MENTEN, J.O.M. Restrição hídrica como alternativa ao método do papel de filtro com congelamento em testes de sanidade de sementes de caupi. **Fitopatologia Brasileira**, v.17, p.226-227, 2002a.

ATHAYDE SOBRINHO, C.; VIANA, F.M.P.; FREIRE FILHO, F.R.; MORAES, S.M.D. **Microrganismos associados às sementes de feijão caupi com ênfasse à presença de *Macrophomina phaseolina***. Teresina: EMBRAPA, CPAMN, 1998. 8p. (EMBRAPA CPAMN. Comunicado Técnico, 88).

ATHAYDE SOBRINHO, C.; BRUNELLI, K.; CAVALCANTI, L. S.; FERREIRA, P. T.O.; MENTEN, J.O. Efeito de discos foliares de diferentes hospedeiros sobre a esporulação de *Macrophomina phaseolina*. **Summa Phytopathologica**, v.29, n.1, p.79, 2003. /Apresentado ao 26. Congresso Paulista de Fitopatologia, Araras, 2003 – Resumo/

ATHAYDE SOBRINHO, C.; OBANDO FLOR, E.P.; CICERO, S.M.; MORAES, M.H.D.; MENTEN, J.O.M. Avaliação comparativa através de imagem de raios-X entre os métodos de congelamento e restrição hídrica como inibidores da germinação de sementes de caupi em testes de sanidade de sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., Sete Lagoas, 2002. **Resumos e palestras**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002b. p. 24.

BANSAL, R.P.; BATHI, P.R.; SEM, D.N. Differential specificity in water inhibition of Indian arid zone. **Biologia Plantarum**, v. 22, p.327-331, 1980.

BARNET, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Minnesota: Burguess Publishing, 1972. 241p.

BARROS, S.T. Microflora fúngica de sementes de feijão macassar, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., e patogenicidade de *Colletotrichum lindemunthianum* (Sacc et Magn) Scrib. Recife, 1980. 81p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

BARROS, S.T.B.; MENEZES, M. Fungos associados às sementes de feijão macassar, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., procedentes do município de Caruaru, Estado de Pernambuco. **Fitopatoloia Brasileira**, v.6, p. 269-275, 1981.

BATISTA, M. F. **Fungos associados a sementes de caupi IPEAN v-69**. Manaus: Embrapa Uepae de Manaus, 1981.2p.(Embrapa Uepae de Manaus. Pesquisa em Andamento, 2).

BATISTA, M. F. Fungos associados a sementes de caupi IPEAN v-69. In: REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA DO CAUPI, 1. Goiânia, 1982. **Resumos**. Goiânia: EMBRAPA CNPAF, 1982. p.279.

BENHAMOU, N.; LAFONTAINE, P. J.; NICOLE, M. Induction of systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. **Phytopathology**, v.84, p.1423-1444, 1994.

BERGAMIN FILHO, A. Ecossistemas, agroecossistemas e patossistemas. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI,Y.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia:** princípios e conceitos. São Paulo: Ceres, 1995. v.1, p.554-573.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G.; Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. In: KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; RESENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 3ed. São Paulo: Ceres, 1997. v.2, p.375-399.

BOLKAN, H.A.; COSTA, C.L.; FERREIRA, R.C. Fungos isolados de 43 variedades de feijoeiro e *Vigna* cultivados em vários Estados do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.3, p.77-78, 1978.

BRACCINI, A.L.; RUIZ, H.A.; BRACCINI, M.C.L.; REIS, M.S. Germinação e vigor de sementes de soja sob estresse hídrico induzido por soluções de cloreto de sódio, manitol e polietileno glicol. **Revista Brasileira de Sementes**, v.18, p.10-16, 1996.

BRASIL, Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura: SNDA DNDV CLAV, 1992. 365p.

BRADFORD, K.J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. **HortScience**, v.21, p.1105-1112, 1986.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantiation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye biding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: ASPP, 2000. p.1102-1156.

BUZI, A.; CHILOSI, G.; DE SILLO, D.; MAGRO, P. Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. **Journal of Phytopathology**, v.152, p.34-42, 2004.

CAMARGO, L. E. A.; BERGAMIN FILHO, A. Controle genético. In: BERGAMIN FILHO, A.;KIMATI, H.;AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia:** princípios e conceitos. São Paulo: Ceres, 1995. p. v.1, 729-760.

CAMARGO, R. Condicionamento fisiológico de sementes de cafeeiro (*Coffea arábica* L.). Lavras, 1998. 108p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley, 1990. 532p.

CARDOSO, J. E. Podridão cinzenta do caule. In: SARTORATO, J.A.; RAVA, C.A. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA, 1994. p. 143-150.

CARDOSO, M.J. **A cultura do feijão caupi no Meio-Norte do Brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2000. 264p.

CARDOSO, M. J.; FREIRE FILHO, F. R.; ATHAYDE SOBRINHO, C. **BR 14 Mulato**: nova cultivar de feijão macassar para o Estado do Piauí. Teresina: Embrapa UEPAE de Teresina, 1990. 4p. (Comunicado Técnico, 48).

CARDOSO, M.J.; ANDRADE JÚNIOR, A.S.; MELO, F.B.; FROTA, A.B. **Avaliação agroeconômica da produção de sementes de caupi sob irrigação**. Teresina: Embrapa, CPAMN, 1995. 6 p.(Embrapa CPAMN. Comunicado Técnico, 62).

CARVALHO, J.C.B. Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemunthianum* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Lavras, 1999, 98 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras.

CAVALCANTI, L. S. Indução de resistência a *Verticillium dahliae* Kleb. em plântulas de cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) cv. Teobahia, por benzotiadiazole (ASM). Lavras, 2000. 82p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras.

CHERIF, M.; BENHAMOU, N.; MENLIES, J. G.; BELANGER, R. R. Silicon induced resistance in cucumber plants against *Pythium ultimum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.41, p.411-425, 1992.

CHIDAMBARAM, P.; MATHUR, S.B. Production of picnidia by *Macrophomina phaseolina*. **Transaction of the British Mycological Society**, v.64, p.165-167, 1975.

CHOUDHURY, M.M. Testes de sanidade de sementes de caupi. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M. (Ed.). ***Patologia de sementes*.** Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.371-385.

CICERO, S.M.; VAN DER HEIJDEN, G.W.M.; VEN DER BURG, W.J.; BINO, R.J. Evaluation of mechanical damage in seeds of maize (*Zea mays* L.) by X-ray and digital imaging. **Seed Science and Technology**, v.26, p.603-612, 1998.

COCHRANE, V.W. **Physiology of fungi**. New York: John Wiley, 1958. 542p.

COELHO NETO, R. A. Metodologia e avaliação da resistência de feijoeiro a podridão cinzenta do caule, em laboratório e casa-de-vegetação. Viçosa, 1994. 54p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

COELHO NETO, R.A.; DHINGRA, O. D. Method for evaluating bean genotype reaction to *Macrophomina phaseolina*. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.236-242, 1996.

COHEN, Y.R. β-Aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens. **Plant Disease,** v. 86, p. 448-457, 2002.

COHEN, Y.R.; NIDERMAN, T; MOSINGER, E.;FLUHR, R. β–Aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants and resistance to late blight infection caused by *Phytophthora infestans*. **Plant Physiology,** v. 104, p. 59-66, 1994.

CORTELAZZO, B.E.; MARAIS, M.F.; LOSELEAU, J.P. Changes in peroxidases in the suspension culture of *Rubus fruticosus* during growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.46, p.27-33, 1996.

COUTINHO, W. M. Uso da restrição hídrica no controle da germinação de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em testes de sanidade. Lavras, 2000. 78p Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras.

COUTINHO, W.M.; MACHADO, J.C.; VIEIRA, M.G.G.C.; GUIMARAES, R.M.FERREIRA, D.F. Uso da restrição hídrica na inibição ou retardamento da germinação de sementes de arroz e feijão submetidas ao teste de sanidade em meio ágar-água. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.2, p.127-135, 2001.

CRUTE, I.R.; HOLUB, E.B.; BURDON, J.J. **The gene-for-gene relationship in plant-parasite interactions.** London: CAB International, 1997. 427p.

DANN, E.K.; DEVERALL, B.J. Activation of systemic disease resistance in pea by an avirulent bacterium or a benzothiadiazole, but not by a fungal leaf spot pathogen. **Plant Pathology**, v. 49, p.324-332, 2000.

DE, D.K.; KAISER, S.A.K.M. Genetic analysis of resistance to stem rot pathogen (*Macrophomina phaseolina*) infecting jute. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.26, p. 1017-1022, 1991.

DHAR, V.; SARBHOY,A.K; DHAR, V. Induced pycnidia production by the soybean isolates of Rhizoctonia bataticola. **Indian Phytopathology**, v.44, p.68-72, 1991.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Biology and pathology of Macrophomina phaseolina**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1978.166p.

ECHÁVEZ-BADEL, R.; BEAVER, J.S. Resistence and susceptibility of beans, *Phaseilus vulgaris* L. to ashy stem blight, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. **Journal of Agriculture of Puerto Rico**, v.75, p.403-405,1987.

FLOOT, B.E.; MOERSCHBACHER, B.M.; REISENER, H.J. Peroxidase isoenzymes patterns of resistant and susceptible wheat leaves following stem rust infection. **New Phytologist**, v.111, p.413-421, 1997.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q. **Caupi: produção, utilização, tipos comerciais e melhoramento genético**. Teresina: Embrapa, BNB, 2000. 4p. (Relatório de Pesquisa)

FREIRE FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q.; BANDEIRA, L.M.R. **Cultivares de feijão caupi recomendadas para o plantio nas regiões Norte e Nordeste**: ano agrícola 1996/97. Teresina: EMBRAPA CPAMN, 1997. 26p. (EMBRAPA CPAMN. Documentos,22).

FRIEND, J. Phenolic substances and the plant disease. In: SUMERE, C. F van.; LEA,P.J. **The biochemistry of plant phenolics**. Oxford: Claredon, 1985. p.367-369.

FROTA, A.B.; PEREIRA, P. Caracterização da produção do caupi na Região Meio-Norte do Brasil. In: CARDOSO, M.J. (Org.). **A cultura do feijão caupi no Meio-Norte do Brasil**. Teresina: Embrapa Meio Norte, 2000. p.28-40.

GANGOPADHYAY, S.; WYLLIE, T. D. Biochemical comparison of nine soybean varieties in relation to their susceptibility to *Macrophomina phaseolina*. **Indian Journal of Mycology and Plant Pathology**, v.3, p.131-140, 1973.

GOMES, V.M.; OLIVEIRA, A.E.A.; XAVIER-FILHO, J. A chitinase and ß-1-3-gucanase from the seeds of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) inhibit the growth of fungi and insect pests of the seed. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.72, p.86-90, 1996.

GÖRLACH, J.; VORATH, S.; KNAUF-BEITER, G.; HENRY, G.; BECKHOVE, V.; KOGEL, K.H.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; WARD, E.; DESSMAN, H.; RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **The Plant Cell**, v.8, p.629-643, 1996.

GOTH, R.W.; OSTAZESKI, S.A. Sporulation of *Macrophomina phaseoli* on propylene oxide-sterilized leaf tissues. **Phytopathology**, v. 55. p.1156, 1965.

GOTTSTEIN, H. D.; KUC, J. Inducion of systemic resistance to anthracnose in cucumber by phosphates. **Phytopathology**, v.79, p.176-179, 1989.

GRAVENA, J.C.; ALVES, C.A.; MORAES, M.H.D.; ATHAYDE SOBRINHO, C.; DEZORDI, C.; MENTEN, J.O.M. Utilização de restriçÃo hídrica no método do papel de filtro para detecção de patógenos em sementes de milho. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., Sete Lagoas, 2002. **Resumos e palestras**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002 p.99.

GRIFFIN, D.H. **Fungal physiology**. New York: Wiley-Liss, 1994. 458p.

GUAZZELLI, R.J. Histórico das pesquisas com caupi no Brasil. In: ARAÚJO, J.P.P.; WATT, E.E. (Org.). **O caupi no Brasil**. Brasília: IITA; EMBRAPA, 1988. p.49-59.

GUIMARÃES, R.M. Efeito do condicionamento osmótico sobre a germinação e desempenho de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) sob condições ideais de estresse térmico, hídrico e salino. Lavras, 1991. 78p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras,.

GUZZO, S.D.; CASTRO, R.M.; KIDA, K.; MARTINS, E.M.F. Ação protetora do acibenzolar-S-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.68, p.89-94, 2001.

GUZZO, S.D.; HARAKAVA, R.; LUCON, NC.M.M.; TSAI, S.M. Resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastratix* e indução local e sistêmica de quitinases e ß-1,3-clucanases por aibenzolar-S-metil. **Summa Phytopathologica**, v.30, p.376-381, 2004.

HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.40, p.347-369, 1989.

HAMMERSCHIMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plant stop pathogens? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, p.77-84, 1999.

HANN, M.G. Microbial elicitors and their receptor in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.34, p.387-412, 1996.

HAWKER, L.E. **The physiology of reproduction in fungi.** Cambridge: University Press, 1957. 128p.

HAWKER, L. E. Environmental influences on reproduction. In: AINSWORTH, G.C.; SUSSMAN, A.S. (Org.). **The fungi**: an advanced treatise. London: Academic Press, 1966. v.2, p:435-469.

HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; TURNER, Y.J. Invigoration of seeds? **Seed Science and Technology**, v.3, p.881-888, 1975.

IGNATIUS, S.J.; CHOPRA, R.K.; MUTHUKRISHNAN, S. Effcts of fungal infection and wounding on the expression of chitinases and ß-1,3-glucanases in near-isogenic lines of barley. **Physiologia Plantarum**, v.90, p.584-592, 1994.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Seed health testing. **Seed Science and Technology**, v.4, p.3-49, 1976.

ISSA, E. Resistência varietal em feijoeiro, *Phaseolus vulgaris* L. à queima cinzenta da haste causada por *Macrophomina phaseoli* (Maubl.)Ashby. **O Biológico**, v.51, p.127, 1985.

JACOBSEN, B.J.; KIEWNICK, S. **Evaluation of IPM-based strategies for control of Cercospora leaf spot of sugar beet.** 1998. http://www.bspp.org.uk/icpp98/abstracts/4.9/3. (14 jun. 2003).

JENSEN, B.D.; LATUNDE-DADA, A.O.; HUDSON, D.; LUCAS, J.A. Protection of *Brassica* seedlings agaist downy mildew and damping-off by seed treatment with CG245704, an activator of systemic acquired resitance. **Pesticide Science***,* v.52, p.63-69, 1998.

KATZ, V.A.; THUKLE, O.U.; CONRATH, U. A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. **Plant Physiology**, v.117, p.1333-1339, 1998.

KESSMANN, H.; RYALS, J. A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. **The Plant Journal**, v.10, p.61-70, 1996.

KESSMANN, H.; STAUB T.; HOFMANN, C.; MAETZKE, T.;HERZOG, J.;WARD, E.; UKNES, S.; RYALS, J. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Plant Pathology**, v.32, p.439-459, 1994.

KIMATI, Y.; BERGAMIN FILHO, A. Princípios gerais de controle. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI,Y.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**: princípios e conceitos. São Paulo: Ceres, 1995. v.1, p.692-709.

KULKARNI, N.B.; PATIL, B.C. Studies on the pycnidial formation by *Macrophomina phaseolina* (Maubl.) Ashby-Size of pycnidia, ostiole and pycnidiospores and its significance. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, v 36, p 311-321, 1968.

KUNZ, H.; SCHURTER, R.; MAETZKE, T. The chemistry of benzothiadiazole plant activators. **Pesticide Science,** v.50, p.275-282, 1997.

LAGERBERG, C.; GRIPWALL, E.; WILK, L. Deteccion and quantification of seed-borne *Septoria nodorum* in naturally grains of wheat with policlonal ELISA. **Seed Sciense and Technology**, v.24, p.393-200, 1996.

LATUNDE-DADA, A.O.; LUCAS, J.A. The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] seedlings for rapid induction of resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology,** v.58, p. 199-208, 2001.

LEE, T.H.; CHUNG, H.S. Detection and transmission of seed-born *Colletotrichum gloeosporioides* in redpepper (*Capsicum annum*). **Seed Science and Technology**, v.23, p.533-541, 1995.

LERTCANAWANICHAKUL, M.; WIWAT, C. Improved shuttle vector for expression of chitinase gene in *Bacillus thuringiensis*. **Letters in Applied Microbiology**, v.23, p.123-128, 2000.

LEUBNER-METZGER, G. Functions and regulation of ß-1,3-gulacases during seed germination, dormancy and after-ripening. **Seed Science Research**, v.13, p. 17-34, 2003.

LEUBNER-METZGER, G.; MEINS JR., F. Functions and regulation of plant ß-1,3-gulacases (PR-2). In: DATTA, S.K.; MUTHUKRISHNAN, S. (Ed.). **Pathogenesis-related proteins in plants**. Florida: CRC Press, 1999. p.49-76.

LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA. Rio de Janeiro: IBGE, v.19, n.12, 2002. 97p.

LILLY, V.G.; BARNETT, H.L. **Physiology of the fungi.** New York: McGraw-Hill, 1951. 410p.

LIMONARD, T. Ecological aspects of seed helath testing. **Proceedings of the International Seed Testing Association***,* v.33, p.1-167, 1968.

LINDSAY, W.P.; LAMB, C.J.; DIXON, R.A. Microbial recognition and activation of plant defense systems. **Trends in Microbiology**, v.1, p.181-187, 1993.

LOPES, E.B.M.; KIMATI, H. Avaliação da reação de girassol (*Helianthus annus*) a *Macrophomina phaseolina* (Tass) Goid. no estádio adulto em condições de campo. **Summa Phytopathologica**, v.14, p.201-209, 1988b.

LOPES, E.B.M.; KIMATI, H. Efeito da concentração de inóculo de *Macrophomina phaseolina* (Tass) Goid. na reação de cinco genótipos de girassol (*Helianthus annus*). **Summa Phytopathologica**, v.14, p.196-200, 1988a.

LUCAS, J.A. **Plant pathology and plant pathogens**. Malden: Blackwell Science, 1998. 274p.

LUCCA FILHO, O.A. Metodologia dos testes de sanidade de sementes In: SOAVE. J.; WETZEL, M.M.V. (Ed.). **Patologia de sementes.** Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.276-298.

LUTRELL, E.S. A pycnidial strain of *Macrophomina phaseoli*. **Phytopathology**, v.36, p.978-980, 1946.

LYON, G.D.; NEWTON, A.C. Do resistance elicitors offer new opportunities in integrated disease control strategies? **Plant Pathology**, v. 46, p. 636-641, 1997.

MACHADO, C.C. Esporulação de *Macrophomina phaseolina* (Tassi)Goid. e viabilidade do método de inoculação de esporos em estudos de seleção de germoplasma resistente**.** Piracicaba, 1980. 75p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

MACHADO, J.C. **Patologia de sementes**: fundamentos e aplicações. Lavras: ESAL; FAEP, 1988. 107p.

MACHADO, J.C. Introdução à patologia de sementes. In: SOAVE. J.; WETZEL, M.M.V. (Ed.). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.3-17.

MAGALHÃES, A.A.; CHOUDHURY, M.M.; MILLAR, A.A.; ALBUQUERQUE, M.M. Efecto del deficit de agua en el suelo en el ataque de *Macrophomina phaseolina* en frijol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.17, p.407-411, 1982.

MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; MALAVOLTA, V.M.A.; KIMATI, H.; SHIBA, S. Avaliação de resistência de alguns cultivares de feijoeiro ao fungo *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. **Summa Phytopathologica**, v.8, p.54-55, 1982.

MARINGONI, A.C.; LAURETTI, R.L.B. Reação de genótipos de feijoeiro comum a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *Macrophomina phaseolina* e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.535-542, 1999.

MATHUR, S.B. Pycnidia formation in *Sclerotium bataticola* Taub. on sunflower. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.58, p.137-140, 1967.

MAYEK-PEREZ, N.; LOPEZ-CASTANHEDA, C.; LOPEZ-SALINAS, E.; CUMPIÁN-GUTIÉRREZ, J.; ACOSTA-GALENOS, J. A. Resistencia a *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. em frijol común em condiciones de campo en México. **Agrociencia**, v.35, p.649-661, 2001.

MENEZES, M.; OLIVEIRA, S.M.A. **Fungos fitopatogênicos**. Recife: UFRPE, 1993. 277p.

MENTEN, J.O.M. Microflora fúngica de sementes de caupi (*Vigna unguiculata*) no Estado do Pará, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 7, p. 470, 1982. /Apresentado ao 15. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, São Paulo, 1982 – Resumo/

MENTEN, J.O.M.; BUENO, J.T. Transmissão de doenças pelas sementes. In: SOAVE. J.; WETZEL, M.M.V. (Ed.). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.192-259.

MENZIES, J.P.; EHRET, D.L.; GLASS, A.D.M.; HELMER, T.; KOCH, C. SEYWERD, F. The influence of silicon on cytological interactions between *Sphaerotheca fuliginea* and *Cucumis sativus*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.39, p.403-414, 1991.

METRAUX, J.P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p.13-18, 2001.

MICHEL, B.E.; RADCLIFFE, D.A. Computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, v. 87, p.126-130, 1995.

MIHAIL, J.D. *Macrophomina*. In: SINGLETON,L.L.; MIHAIL, J.D.; RUSH,C.M. (Ed.). **Methods for research on soilborn phytopathogenic fungi.** St.Paul: APS Press, 1992. p.134-136.

MILOSEVIC, N.; SLUSARENKO, A.J. Active oxygen metabolism and lignification in the hypersensitive response in bean.**Physiology and Molecular Plant Pathology**, v.49, p.143-157, 1996.

MIRANDA, P.; BRITO, P.F.R; MARANHÃO, E.H.A. **Cultivo de feijão macassar**. Recife:IPA, 1984. 3p.(Instruções Técnicas).

MOHAN, S.K.; BIANCHINI, A.; MENEZES, J.R. **Doenças do feijoeiro no Estado do Paraná**: guia para identificação e controle. IAPAR: Londrina, 1983. 56p.

MORAES, J.P. Mecanismos de resistência sistêmica adquirida em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.6, p.261-284, 1998.

MORAES, S.A.; SOAVE, J. Fungos em sementes. In: SOAVE. J.; WETZEL, M.M.V. (Ed.). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.18-67.

MORRIS, S. W.; VERNOOIJ, B.; TITATARN, S.; STARRET, M.; THOMAS, S.; WILTSE, C. C.; FREDERIKSEN, R. A. BRANDHUFALCK, A.; HULBERT, S.; UKNES, S. Induced resistance responses in maize. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.11, p.643-658, 1998.

NAKAWURA, C.K.; MATHUR, S.B.; ADIPALA, E. Seed-borne fungi seed health of cowpea. **Crop Science Conference Proceedings**, v.3, p.1099-1104, 1997.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: Mac Millan Press, 1979. v.2, 1191p.

NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenoilic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, p.369-389, 1992.

OLAYA, G.; ABAWI, G.S. Effect of water potential on mycelial growth and on production and germination of sclerotia of *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, v. 80, p.1347-1350, 1996.

OLIVEIRA, J.A.; MACHADO, J.C.; VIEIRA, M.G.G.C.; ALVES, M.C. Uso de restrição hídrica no controle de germinação de sementes em teste de sanidade, pelo método de incubação em papel de filtro. **Informativo ABRATES**, v.11, p.258, 2001.

OLIVEIRA, M.Z.A. Fungos associados a sementes de caupi: Identificação, patogenicidade e controle. Brasília, 1981. 151p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília.

OLIVEIRA, M.Z.A. Fungos associados a sementes de feijão procedentes da região nordeste do Estado da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, v.9, p.379, 1984.

OLIVEIRA, M.Z.A.; BOLKAN.A.H. Microflora fúngica de sementes de dezoito variedades de caupi. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE CAUPI,1., Goiânia, 1982. **Resumos**. Goiânia: EMBRAPA, CNPAF, 1982. p.284-285.

OLIVEIRA, M.Z.A.; BOLKAN.A.H. Microflora fúngica de sementes de dezoito variedades de caupi cultivadas em vários estados brasileiros. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, p.577, 1981.

OLIVEIRA, S.M.A.; DANTAS, S.A.F.; GURGEL, L.M.S. Indução de resistência em doenças de pós-colheita. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.12, p.343-371, 2004.

ONESIROSAN, P.T. Seedborne and weedborne inoculum in web blight of cowpea. **Plant Disease Reporter**, v.59, p. 338-339, 1975.

OSSWALD, W.F.; STANGARLIN, J.R.; NICHOLSON, R.L.; BRUMMER, M.; WULF, N.A.; DI PIERO, R.M.; PICCININ, E.; DI CIERO, L.; HOTO, F.V.; PASCHOLATI, S.F. The effect of acibenzolar-S-methyl on phytoalexin and PR-protein induction on sorghum mesocotyls and on *Colletotrichum sublineorum*. **Summa Phytopathologica**, v.30, p.415-420, 2004.

OSTAZESKI, S.A. Sporulation of *Lepodiscus terrestris* on propylene oxide sterilized culture media and a techique for differentiating some sclerotial fungi. **Plant Disease Reporter**, v.48, p.770, 1964.

PAIVA, J.B.; TEÓFILO, E.R.; SANTOS, J.H.R. dos; LIMA, J.A.A.; GONÇALVES, M.F.B.; SILVEIRA, L. F.S. **"Setentão"**: nova cultivar de feijão-de-corda para o Estado do Ceará. Fortaleza: UFC, 1988. (Folder).

PANIZZI, R. C. Cultivares resistentes e tratamento químico de *Macrophomina phaseolina* (Tass) Goid. em feijoeiro *(Phaseolus vulgaris* L.). Piracicaba, 1988. 151p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

PASCHOLATI, S.F. Bioquímica fitopatológica e indução de resistência. **Fitopatologia Brasileira,** v. 24, p. 241, 1999.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**: princípios e conceitos. Piracicaba: Ceres, 1995. p. 417-453.

PASCHOLATI, S. F.; NICHOLSON, R.L.; BUTLER, L.G. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin accumulation in wounded maize mesocotyls. **Journal of Phytopathology,** v. 115, p. 165-172, 1986..

PASTOR-CORRALES, M.; ABAWI, G.S. Reactions of selected bean accesions to infection by *Macrophomina phaseolina* **Plant Disease,** v.72, p.39-41, 1988.

PEREZ, J.O. Análise patogênica e isoenzimática de isolados de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. e reações de cultivares e linhagens de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). Recife, 1998. 94p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

PETRUZZELLI, L.; KUNZ, C.; WALDVOGEL, R.; MEINS, F.; LEUBNER-METZGER, G. Distinct ethylene and tissue specific regulation of ß-1,3-glucanases and chitinases during pea seed germination. **Planta**, v.209, p.195-201, 1999.

PIETERSE, C.M.J.; WEES, S.C.; VAN PELT, J.A.; KNOESTER, M.; LAAN,; GERRITS, H.; WEISBEEK, P.J.; VAN LOON, L.C. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v 10, p.1571-1580, 1998.

PIETERSE, C.M.J.;VAN LOON, L. C. Salicylic acid-independent plant defense pathways. **Trends in Plant Science**, v.4, p.52-58, 1999.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba: Nobel, 1985. 466p.

PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS FILHO, F.M. Doenças do caupi. In: KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; RESENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 3ed. São Paulo: Ceres, 1997. v.2, p.233-244.

PONTE, J.J. **Clínica de doenças de plantas**. Fortaleza: EUFC, 1996. 605 p.

PONTE, J.J. **Fitopatologia**: princípios e aplicações. São Paulo: Nobel, 1980. 250p.

PORTO, M.D.M. Routine tests for seed-borne viruses. In: INTERNATIONAL ADVANCED COURSE, Brasília, 1987. **Proceedings**. Brasília: ABRATES, 1987. p. 128-133.

POZZA, A.A.A.; POZZA, E.A.; BOTELHO, D.M.S. O silício no controle de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.12, p.373-402, 2004.

PRITSCH, C.P.; MUEHLBAUER, G.J.; BUSHNELL, W.R.; SOMERS, D.A.; VANCE, C.P. Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, p. 159-69, 2000.

PUNJA, Z.K. Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens – a review of progress and future prospects. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.23, p.216-235, 2001.

REIS, E.M. Efeito da concentração de inóculo de *Colletotrichum dematium* f. *truncata* (Schnw.) Von Arx na reação de variedades de soja (*Glycine Max* (L.) Merr.). Piracicaba, 1973. 48p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

RESENDE, M.L.V.; NOJOSA, G.B.A.; CAVALCANTI, L.S.; AGUILAR, M.A.G.; SILVA, L.H.C.P.; PEREZ,J.O.; ANDRADE, G.C.G.; CARVALHO,G.A.; CASTRO, R.M. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis perniciosa* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology,** v.5, p.621-628, 2002.

RICHARDSON, M.J. **An anonotated list of seed-borne diseases**. Zurich: ISTA, 1983. 107 p.

RIOS, G.P. Doenças fúngicas e bacterianas do caupi. In: ARAÚJO, J.P.P.; WATT, E.E. (Org.). **O caupi no Brasil**. Brasília: IITA, EMBRAPA, 1988. p.549-589.

RODRIGUES, V. J. L. B.; MENEZES, M.; COELHO, R. S. B; MIRANDA, P. Identificação de fontes de resistência em genótipos de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walpers.) a *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid., em condições de casa-de-vegetação. **Summa Fitopathologica**, v.23, p.170-172, 1997a.

RODRIGUES, V.J.L.B; MENEZES, M.; COELHO, R.S.B Efeito da temperatura, papel de filtro e meio de cultura na fisiologia de *Macrophomina phaseolina*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 40, n.1, p 197-203, 1997b.

ROSS, A.F. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. **Virology**, v.14, p.340-358, 1961.

RYALS, J.A.; NEUENSCHWANDER, U.H.; WILLITS, M.G.; MOLINA, A.; STEINER, H.Y.; HUNT, M.D. Systemic acquired resistance. **Plant Cell**, v.8, p.1809-1829, 1996.

SACKSTON, W.E. *Sclerotium bataticola* on seeds of cowpea (*Vigna sinensis*). **Plant Diseases Reporter**, v.53, n.6, p.438-439, 1969.

SAKAMOTO, K.; TADA, Y.; YOKOZEKI, Y.; AKAGI, H.; AYASHI, N.; FUJIMURA, T.; ICHIKAWA, N. Chemical induction of disease resistance in rice is correlated with the expression of a gene encoding a nucleotide binding site and leucine-rich repeats. **Plant Molecular Biology**, v.40, p.847-855, 1999.

SALLIS, M.G.V.; LUCCA-FILHO, O.A..; MAIA, M.S. Fungos associados às sementes de feijão miúdo (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) produzidas no município de São José do Norte (RS). **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, p.36-39, 2001.

SAMUELS, A.L.; GLASS, A.D.M.; MENZIES, J.G.; EHRET, D.L. Silicon in cell walls and papillae of *Cucumis sativus* during infection by *Sphaerotheca fuliginea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.44, p.237-242, 1994.

SANTOS, A.F.; ATHAYDE, J.T.; DAN, E.L. Microflora associada às sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) no Estado do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, v.9, p.379, 1984.

SANTOS, W.D.; FERRARESE, M.L.; FINGER, A.; TEIXEIRA, A.C.N.; FERRARESE FILHO, O. Lignification and related enzymes in *Glycine max* root growth-inhibition by feluric acid. **Journal of Chemical Ecology**, v.30, p.1203-1212, 2004.

SAS INSTITUTE. **SAS system**. Cary, 1993. 18v.

SIEGRIST, J.; MUHLENBECK, S.; BUCHENAUER, H. Cultured parsley cell, a model system for rapid testing of abiotic and natural substances as inducers of systemic acquired resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology,** v. 53, p. 223-238, 1998.

SILVA, L.H.C.P. Resistência sistêmica ativada pelo acibenzolar-S-metil contra doenças em tomateiro. Lavras, 2002. 89p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras.

SMIT, F.; DUBERY, I.A. Cell wall reinforcement in cotton hypocotyls in response to a *Verticillium dahliae* elicitor. **Phytochemistry**, v.44, p.811-815, 1997.

SMITH, J.A.; HAMMERSCHIMIDT, R. Comparative study of acidic peroxidases associated with induced resistance in cucumber, muskmelon and watermelon. **Physiological and Molecular Plant Pathology,** v. 33, p. 255-261, 1998.

SMITH, J.A.; HAMMERSCHIMIDT, R.; FULBRIGHT, D.W. Rapid induction of systemic resistance in cucumber by *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.38, p.223-235, 1991.

SMITH, J.E.; KORSTEN, L.; AVELING, T.A.S. Evaluation of seed treatments of reducing *Colletottrichum dematium* on cowpea seed. **Seed Science and Technology**, v.27, p.591-589, 1999.

SOUZA, P.E.; DUTRA, M.R. **Fungicidas no controle e manejo de doenças de plantas**. Lavras: Editora UFLA, 2003. 174p.

SRINIVASAN, M.C.; CHINDAMBARAM, P.; MATHUR, S.B.; NEERGAARD, P. A simple method for inducing sporulation in seed-borne fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v.56, p.31-35, 1971.

STADNIK, M.J.; BUCHENAUER, H. Accumulation of autofluorogenic compounds at the penetration site of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* is associated with both benzothiadiazole-induced and quantitative resistance in wheat. **Journal of Phytopathology**, v.147, p.615-622, 1999.

STADNIK, M.J.; BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology,** v. 57, p. 25-34, 2000.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; METRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.35, p.235-270, 1997.

SUTTON, B.C. **The coelomycetes**. Kew: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1980. 696p.

TANAKA, M.A.S. Técnicas auxiliares em laboratório de patologia de sementes. In: SOAVE. J.; WETZEL, M. M.V. (Ed.). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.313-328.

TOLEDO, F.F.; MARCOS FILHO, J. **Manual das sementes**: tecnologia da produção. São Paulo:Ceres, 1977. 224p.

VAN DER MOEZEL, P.G.; BELL, D.T. The effect of salinity on the germination of some Western Austrália *Eucalyptus* and *Malaleuca* species. **Seed Science and Technology**, v.15, p.239-246, 1987.

VECHIATO, M.H.; CASTRO, J.L.; ISHIMURA, I.; SABINO, J.C.; MENTEN, J.O.M. Antracnose do feijoeiro: correlação entre severidade em vagem e a incidência do patógeno nas sementes. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.159-163, 1997.

VENÂNCIO, W.S.; ZAGONEL, J.; FURTADO, E.L.; SOUZA, N.L.; PERES, N.A.R. Novos fungicidas. II – Famaxadone e indutores de resistência. **Revisão Anual de Patologia de Plantas,** v. 8, p. 59-92, 2000.

VIDHYASEKARAN, P. **Fungal pathogenesis in plants and crops:** molecular biology and host defense mechanisms. New York: Marcel Dekker, 1997. 553p.

WALKER, R.J.C. Use of environmental factors in screening for disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.3, p. 197-208, 1965.

WATANABE, T. Pycnidium formation by fifty different isolates of *Macrophomina phaseoli* originated from soil or kidney bean seed. **Annals of Phytopathatological Society of Japan**, v. 38, p: 106-110, 1972.

WENKERT, W.; LEMON, E.R.; SINCLAIR, T.R. Leaf elongation and turgor pressure in field grown soybean **Agronomy Journal**, v.70, p.761-764, 1978.

WILLIAMS, R.J. Diseases of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. in Nigeria. **PANS**, v. 21, p.253-267, 1975.

WONG, Y.S.; MACLACHLAN, G.A. 1,3-ß-D-glucanases from *Pisum sativum* seedlings III. Development and distribution of endogenous substrates. **Plant Physiology**, v.65, p.222-228, 1980.

WU, S.W.; CHEN, T.W. Development of a new semiselective medium for detecting *Alternaria brassicicola* in cruciferous seeds. **Seed Science and Technology**, v.27, p.397-409, 1999.

YE, X.P.; PAN, S.Q.; KUC, J. Specificity of induced systemic resistance as elicited by ethefon and tobacco mosaic virus in tobacco. **Plant Science**, v.84, p.1-9, 1992.

YOSHIKAWA, M.; YAMAOKA, N.;TAKEUCHI, Y. Elicitors: their significance and primary models of action in the induction of plant defense reactions. **Plant and Cell Physiology**, v.34, p.1163-1173, 1993.

ZIMMER, D.E.;HOES, J.A. Diseases. In: CARTIER, J.F. (Ed.). **Sunflower science and technology**. Madison: Soil Science Society of America, 1978. p.225-326.