



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Soja
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1516-781X
Setembro, 2005

Documentos 264

Patologia e Tratamento de Sementes: Noções Gerais

Ademir Assis Henning

Londrina, PR
2005

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Soja

Rodovia Carlos João Strass - Acesso Orlando Amaral

Caixa Postal 231

86001-970 - Londrina, PR

Fone: (43) 3371-6000 - Fax: (43) 3371-6100

Home page: <http://www.cnpso.embrapa.br>

e-mail (sac): sac@cnpso.embrapa.br

Comitê de Publicações da Embrapa Soja

Presidente: *João Flávio Veloso Silva*

Secretária executiva: *Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite*

Membros: *Alexandre Magno Brighenti dos Santos*

Antonio Ricardo Panizzi

Clara Beatriz Hoffmann-Campo

Décio Luiz Gazzoni

George Gardner Brown

Ivan Carlos Corso

Léo Pires Ferreira

Waldir Pereira Dias

Coordenador de editoração: *Odilon Ferreira Saraiva*

Normalização bibliográfica: *Ademir Benedito Alves de Lima*

Editoração eletrônica: *Neide Makiko Furukawa*

Capa: *Danilo Estevão*

1ª Edição

1ª impressão 08/2004 - tiragem: 2000 exemplares

2ª Edição revisada e atualizada

1ª impressão 09/2005 - tiragem 2000 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Henning, Ademir Assis

Patologia e tratamento de sementes: noções gerais /
Ademir Assis Henning. 2.ed. – Londrina: Embrapa Soja,
2005.

52p. ; 21cm. - (Documentos / Embrapa Soja, ISSN
1516-781X; n.264)

1.Patologia de semente. 2.Soja-Semente-Tratamen-
to. I.Título. II.Série.

CDD 575.6839

© Embrapa 2005

Autor

Ademir Assis Henning

Engº Agrº, MSc, Ph.D., Pesquisador

Embrapa Soja

Rod. Carlos João Strass

Caixa Postal, 231

CEP 86001-970 - Londrina, PR

Fone: (43) 3371-6261 Fax: 3371-6100

henning@cnpso.embrapa.br

Apresentação

A soja é afetada, no campo, por grande número de patógenos. Fungos, bactérias e vírus podem causar sérios prejuízos à agricultura em geral. Muitos desses patógenos utilizam a semente como veículo de sobrevivência e de disseminação a longas distâncias.

Na moderna indústria de sementes, o controle de qualidade deve ser exercitado em todas as fases do processo de produção, desde a seleção do campo de produção até a comercialização de um lote de sementes.

Esta publicação aborda, de maneira sucinta, os principais métodos de análise sanitária de sementes, com ênfase à cultura da soja e poderá ser um referencial não só para os produtores de sementes, mas para os órgãos governamentais orientadores da política agrícola.

A análise sanitária da semente, juntamente com outros testes fisiológicos como tetrazólio, germinação e vigor, dentre outros, pode esclarecer as causas de problemas de baixa qualidade da semente, além de orientar, com maior precisão, a necessidade ou não do tratamento da semente com fungicidas.

Este trabalho destina-se, em princípio, a profissionais de laboratórios de análise de sementes, envolvidos com testes de sanidade, a instituições governamentais e a Escolas de Agronomia que priorizam essa disciplina e, sua grade curricular.

João Flávio Veloso Silva

*Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento
Embrapa Soja*

Sumário

Resumo	9
Abstract	11
I. Noções gerais	13
Histórico	13
Importância da patologia de sementes	17
Testes de sanidade de sementes	18
Fatores de variação nos testes de incubação	27
II. Soja - Patologia e tratamento de sementes	31
Introdução	31
Análise sanitária de sementes de soja	31
Doenças na cultura e patógenos importantes nas sementes	34
Tratamento de sementes	47
Referências	50

Patologia e Tratamento de Sementes: Noções Gerais

Ademir Assis Henning

Resumo

A importância da patologia de sementes reside no fato de que aproximadamente 90% das culturas utilizadas para a alimentação são propagadas por semente. Dentre essas, nove são consideradas de importância primordial: soja, trigo, arroz, milho, feijão, amendoim, sorgo, cevada e beterraba açucareira.

Todas essas culturas podem ser afetadas por patógenos muito agressivos transmitidos através da semente. Assim, o teste de sanidade de semente pode ser considerado como “medicina preventiva”, tanto nos programas de quarentena quanto no sistema de produção de semente certificada.

Nesta publicação, em sua primeira parte, são abordados os principais aspectos da patologia de sementes, como os seus históricos no mundo e no Brasil, os diferentes métodos utilizados e os fatores que podem causar variação nos resultados dos testes. Em sua segunda parte, são discutidos, em detalhe, os principais patógenos causadores de doenças na cultura da soja que são transmitidos pela semente.

Dentre esses, destacam-se, *Phomopsis* sp. e *Fusarium semitectum*, causadores de problemas de germinação no laboratório quando ocorrem chuvas durante as fases de maturação e colheita da semente (podridão de semente); *Diaporthe phaseolorum* f.sp. *meridionalis* (*Phomopsis meridionalis*) (cancro da haste); *Colletotrichum truncatum* (antracnose); *Cercospora kikuchii* (mancha púrpura); *Cercospora sojina* (mancha olho-de-rã); *Sclerotinia sclerotiorum* (podridão branca); *Sclerotium rolfsii* (tomamento e morte de plantas); *Macrophomina phaseolina* (podridão de

carvão); *Rhizoctonia solani* (tombamento) e *Aspergillus* spp. (*A. flavus*) que, além de ser considerado fungo de armazenagem, é responsável pela podridão da semente no solo, quando a semeadura é feita em solos com baixa disponibilidade de água, sem o tratamento da semente com fungicida.

Finalmente é discutida a importância do tratamento de semente de soja com fungicidas, cuja tecnologia, desde a safra 2001/02, vem sendo utilizada em mais de 93% da área semeada com soja no Brasil.

Abstract

Seed pathology and treatment: an overview

The importance of seed pathology lies on the fact that approximately 90% the crops used for feeding are propagated through seeds. Among these, nine are of major importance: soybean, wheat, rice, dry bean, peanut, sorghum, barley and sugar beet.

All of them can be affected by devastating seed transmitted pathogens. Thus, seed health testing may be considered as a kind of “preventive medicine” in quarantine schemes as well as in certified seed production programs.

This publication, in its first part covers the main aspects of seed pathology throughout the world and Brazil, discussing the different methods of seed health testing and the factors responsible for the variation in their results.

In its second part, a detailed discussion on the main seed-transmitted pathogens affecting soybean in the field is presented. Among those are: *Phomopsis* sp. and *Fusarium semitectum*, causing germination problems in the laboratory, when seed maturation and harvest occur under moist-weather-conditions; *Diaporthe phaseolorum* f.sp. *meridionalis* (*Phomopsis meridionalis*), the stem canker agent; *Colletotrichum truncatum* (anthracnose), *Cercospora kikuchii* (purple seed stain); *Cercospora sojina* (frog eye leaf spot); *Sclerotinia sclerotiorum* (white mold); *Sclerotium rolfsii* (dumping off and southern blight); *Macrophomina phaseolina* (charcoal rot), *Rhizoctonia solani* (dumping off); and, *Aspergillus* spp. (*A. flavus*), that in addition of being a storage mold may be responsible for seed rot in the soil, when untreated seed is sown in soils with low moisture availability (drought stress).

At the end, it is discussed the importance of soybean seed treatment with fungicides, that since the 2001/02 growing season, is used in over 93% of the area planted to soybean in Brazil.

I. Noções gerais

Histórico

Apesar de relatos anteriores sobre a associação de patógenos com sementes, foi em 1755 que a Patologia de Sementes teve seu início quando Tillet, na França, provou que semente de trigo transmite a cárie (*Tilletia caries*). Posteriormente, outros estudos foram conduzidos por Prevost em 1807, Jensen em 1887, Frank em 1888 e Hiltner em 1917. Entretanto, foi somente em 1927 que o ramo da ciência denominado Patologia de Sementes passou a ser internacionalmente reconhecido, quando a ISTA (*International Seed Testing Association*) criou o Comitê de Fitopatologia. Lucie Doyer (Holanda) foi a primeira coordenadora desse comitê até a sua morte, em 1949.

Nas Américas, a Patologia de Sementes tem recebido pouco reconhecimento, especialmente nos Estados Unidos onde a mesma é considerada como sub-disciplina da fitopatologia, apesar das relevantes contribuições no campo da epidemiologia e do controle de importantes patógenos transmitidos por sementes, como o vírus do mosaico da alface (LMV). Só recentemente, a Patologia de Sementes passou a receber maior atenção, particularmente nos programas de controle de qualidade das indústrias de sementes.

No Brasil, o estudo da Patologia de Sementes ganhou impulso a partir de 1977, com a realização de um workshop¹, que reuniu, em Londrina-PR, os maiores especialistas mundiais nessa área. Juntamente com a criação do Programa Brasileiro de Patologia de Sementes, o programa é considerado o marco inicial deste novo ramo da ciência agrônômica no país. Na esteira desse impulso, foi criado na Abrates o Comitê de Patologia de

¹ *LATIN AMERICAN WORKSHOP ON SEED PATHOLOGY, 1., 1979, Londrina. Seed pathology problems and progress: proceedings. Londrina: IAPAR, 1979. 274p. Editado por J.T. Yorinori, J.B. Sinclair, Y.R. Mehta, S.K. Mohan.*

Sementes (COPASEM), livros foram editados e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou o Grupo Técnico Permanente em Sanidade de Sementes (GTPSS). A associação desses fatores proporcionou ao Brasil uma posição de destaque nos assuntos relacionados à patologia de sementes e os conhecimentos gerados foram gradualmente sendo incorporados ao sistema produtivo, repercutindo na maior sustentabilidade e lucratividade da agricultura.

O GTPSS criado através da Portaria nº 27 de 7 de agosto de 2000, tem por objetivo propor metas para o Programa de Sanidade em relação a Pragas não Quarentenárias Regulamentáveis, análise e emissão de parecer técnico relativo aos estudos técnico-científicos que justifiquem as proposições de níveis de tolerância para as citadas pragas, principalmente, para estudar a produção e comercialização de sementes no território nacional. O grupo, liderado pela Coordenação de Proteção de Plantas (MAPA/ CPP/DDIV) é constituído por membros representantes das seguintes instituições/órgãos: 1) Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (MAPA/SARC/SNPC); 2) Coordenação de Laboratório Vegetal (MAPA/CLAV/DDIV); 3) Comitê de Patologia de Sementes da ABRATES (COPASEM); 4) Universidades (ESALQ/USP - Piracicaba) e (ESAL - Lavras); 5) Embrapa Cerrados; 6) Embrapa Negócios Tecnológicos; 7) Associação Brasileira de Sementes - ABRASEM); 7) Representante das CESH's - Comissão Estadual de Sementes e Mudanças do Paraná - CESH/PR) e 8) Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes - ABRATES, além de outros órgãos representantes do setor agropecuário.

O objetivo do GTPSS é estudar e propor padrões e tolerâncias de sanidade de sementes para diversas culturas, começando pelas grandes culturas. A importância da comissão reside em sua composição, que reúne os mais diversos segmentos envolvidos no agronegócio. Desta maneira, praticamente todos os aspectos, tanto quantitativos como qualitativos e de logística, são contemplados. Já foram propostos níveis de tolerância de patógenos em sementes para algumas espécies, como trigo, soja, feijão, arroz e algodão (Tabela 1). Isto para (PNQR) - as Pragas Não-Quarentenárias Regulamentadas (pragas que o país já tem e que podem

Tabela 1. Pragas Não Quarentenárias Regulamentadas (PNQR) Potenciais / cultura e seus respectivos níveis de tolerância, aprovados pelo GTPSS.		
Cultura	PNQR – Potenciais	Nível de tolerância (%)
Algodão	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i>	Zero / lote
	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Zero / lote
	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	Zero / campo
	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> **	Zero / lote
Arroz (sequeiro)	<i>Pyricularia grisea</i>	5 / lote
	<i>Bipolaris oryzae</i>	5 / lote
Trigo	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	5 / lote
	<i>Stagonospora nodorum</i>	1 / lote
	<i>Drechslera tritici-repentis</i>	5 / lote
	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>undulosa</i>	1.000 UFC*/l;
Feijão	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Zero / lote
	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	0 / lote
	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> **	0 / lote
	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i>	0 / lote
	<i>Fusarium solani</i> f.sp. <i>phaseoli</i>	0 / lote
Soja	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> **	0 / lote
	<i>Heterodera glycines</i> ***	0 / lote
Girassol	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> **	0 / lote

*UFC = Unidade Formadora de Colônia; ** Esclerócio/500 g; ***Torrão com cisto/500 g.

oferecer risco). Para essas pragas é necessária a elaboração da Análise de Riscos, baseada em normas internacionais, com o objetivo de evitar barreiras comerciais não técnicas. Porém, uma vez estabelecido o nível de tolerância de determinado patógeno, fica implícito que todos os lotes de sementes daquela espécie devem ser submetidos à análise sanitária. Entretanto a ABRATES (Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes) e a ABRASEM (Associação Brasileira de Sementes) colocaram objeções a esse conceito, por entender que o país ainda não está estruturado em termos de laboratórios credenciados para tal fim - hoje são menos de 30, dos quais nem todos estão aptos para realizar análise sanitária de todas as espécies. A posição da ABRATES e da ABRASEM foi favorável ao estabelecimento dos padrões de sanidade de sementes, desde que sua implantação seja gradativa, para não inviabilizar o programa de produção de sementes do Brasil.

Felizmente essa sugestão foi acatada por parte do MAPA/SDA/DDIV, sendo que no anexo da Portaria nº 3, de 5 de janeiro de 2004, publicada no Diário Oficial da União, o projeto da Instrução Normativa SDA, que encontra-se em consulta pública, estabelece em seu Art. 3º que ...”*A implantação dos padrões sanitários de sementes estabelecidos no Art. 1º desta Instrução Normativa, bem como as ações dos órgãos fiscalizadores, obedecerão aos seguintes critérios e cronograma:*

- ♦ *primeiro ano: estruturação da cadeia produtiva de sementes, mediante o credenciamento e adequação de laboratórios, capacitação técnica de pessoal, validação das metodologias de análise e amostragem, e o estabelecimento e adequação dos procedimentos de fiscalização por parte dos órgãos fiscalizadores, com monitoramento, ao acaso, das sementes aprovadas no Art. 1º;*
- ♦ *segundo ano: fiscalização dos níveis de tolerância estabelecidos em sementes básicas;*
- ♦ *terceiro ano: fiscalização dos níveis de tolerância estabelecidos em sementes básicas;*
- ♦ *quarto ano: fiscalização dos níveis de tolerância estabelecidos em sementes básicas e sementes certificadas de primeira geração C1;*

- ♦ *quinto ano: fiscalização dos níveis de tolerância estabelecidos em sementes básicas e sementes certificadas de primeira geração C1;*
- ♦ *sexto ano: fiscalização dos níveis de tolerância estabelecidos em sementes básicas, sementes certificadas de primeira geração C1 e sementes certificadas de segunda geração C2;*
- ♦ *a partir do sétimo ano fiscalização dos níveis de tolerâncias estabelecidos para todas as classes de sementes.*

Art. 4º. Os níveis de tolerância aprovados e suas respectivas metodologias de análise, bem como a inclusão de novas culturas, poderão ser alterados ou incluídos, a qualquer tempo, mediante estudos técnicos-científicos (Análise de Risco de Pragas - ARP) e parecer favorável do Grupo Técnico Permanente de Sanidade de Sementes, os quais serão fixados por ato administrativo da Secretaria de Defesa Agropecuária.

Art. 5º. Esta Instrução Normativa entra em vigor na data da sua publicação.

Importância da patologia de sementes

Aproximadamente 90% das culturas utilizadas para alimentação são propagadas por sementes. Dentre essas, nove são consideradas de importância primordial: soja, trigo, arroz, milho, feijão, amendoim, sorgo, cevada e beterraba açucareira.

Todas podem ser afetadas por patógenos devastadores transmitidos através da semente (Neergaard 1979). Assim, o teste de sanidade de semente pode ser considerado como “medicina preventiva”, tanto nos programas de quarentena quanto no sistema de produção de semente melhorada. Mas para que os testes de sanidade de sementes se tornem eficientes, devem predizer, com relativa precisão, o comportamento dos principais patógenos associados às sementes.

Testes de sanidade de sementes

Requisitos básicos

O teste de sanidade deve fornecer informações confiáveis acerca da qualidade sanitária da semente destinada à semeadura ou aos serviços de quarentena. Os resultados, além de serem reproduzíveis, devem estar disponíveis em curto espaço de tempo, mantendo, dentro de limites aceitáveis, os custos da mão de obra e dos equipamentos.

Objetivos dos testes de sanidade

Os testes de sanidade têm como objetivo determinar a condição sanitária da amostra de sementes e, por inferência, a qualidade do lote, fornecendo informações para:

- ♦ o serviço de quarentena;
- ♦ os esquemas de certificação de sementes;
- ♦ a avaliação do valor cultural;
- ♦ a determinação da necessidade do tratamento de sementes;
- ♦ a avaliação da eficiência do tratamento de sementes;
- ♦ os testes de qualidade dos grãos armazenados (fungos de armazenagem); e
- ♦ a avaliação da resistência de cultivares.

Importância

O inóculo presente na semente poderá resultar em aumento progressivo de uma dada doença no campo, podendo reduzir o valor comercial da cultura. Além disso, sementes infectadas podem introduzir patógenos importantes como *Peronospora tabacina* (mofo azul do tabaco), *Plasmopara halstedii* (míldio do girassol), *Diaporthe phaseolorum* f.sp. *meridionalis* (cancro da haste da soja), dentre outros, em áreas antes livres dessas

doenças. Os dois últimos são exemplos típicos do que ocorreu no Brasil. O míldio do girassol foi introduzido, via semente, no início da década de 80 (Ferreira et al., 1983) e, em 1989, o agente causal do cancro da haste foi detectado na região de Ponta Grossa (PR). A doença rapidamente se alastrou por todas as regiões produtoras de soja do Brasil e outros países da América do Sul causando enormes prejuízos aos produtores (Yorinori, 1990).

Os testes de sanidade de sementes também podem esclarecer as causas da baixa germinação, comum em amostras com elevados índices de infecção. Um exemplo típico dessa situação é fornecido pelo DIACOM (diagnóstico completo) que esclarece a baixa germinação de sementes de soja nos testes de germinação em laboratório, quando estas estão com altos índices de *Phomopsis* spp. (Henning & França Neto, 1980, 1984).

Métodos utilizados

A escolha de determinado método, entre os vários existentes, depende do tipo de patógeno envolvido, das condições disponíveis e dos propósitos do teste (Neergaard, 1979). A ISTA, através do seu *Handbook on Seed Health Testing*, tem publicado metodologias para diferentes patógenos, em diversas culturas. Além disso, excelente fonte de referência em português é o livro “Patologia de Sementes” editado por Soave & Wetzel e publicado, em 1987, pela ABRATES/COPASEM, com apoio da Fundação Cargill.

Métodos sem incubação

a) **Inspeção direta:** as sementes são examinadas a seco para determinar impurezas (material inerte, escleródios, galhas, insetos); sintomas típicos de determinadas doenças, a mancha café (VMCS) e mancha púrpura (*Cercospora kikuchii*); deformações e sinais de infecção tais como picnídios, crosta de oospóros, etc. A inspeção a seco pode, algumas vezes, ser efetuada sob luz ultravioleta onde alguns organismos produzem fluorescência característica. *Ascochyta pisi* causa

fluorescência verde-amarelada em ervilha (*Pisum sativum*); *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* produzem fluorescência azul-esbranquiçada, em feijão branco ou de cor creme (*Phaseolus vulgaris*); e, *Septoria nodorum* produz fluorescência esverdeada, em sementes de trigo (*Triticum aestivum*).

- b) **Sementes imersas em água ou lactofenol:** método usado para facilitar a identificação de *Septoria nodorum*, em trigo (picnídios exudam esporos) e dos nematóides *Aphelenchoides besseyi* e *Ditylenchus angustus*, em arroz.
- c) **Exame da suspensão após a lavagem das sementes:** uma quantidade de semente é agitada por determinado período de tempo em uma quantidade de água que poderá conter detergente ou dispersante. A centrifugação é opcional. Os esporos são contados em hemacitômetro. O uso de espectrofotômetro para a determinação dos esporos em suspensão, após a calibração, é muito mais fácil e rápido do que o do hemacitômetro. O exame, após a lavagem da semente, é um método muito usado para determinar a quantidade de esporos de carvão (*Ustilago* spp.) em cereais, porém pode ser usado para outros fungos. O método é rápido e barato, pois não necessita de equipamento especial nem de incubação. As principais limitações são: 1) só pode ser usado para esporos que aderem fracamente na parte externa da semente; 2) o teste de viabilidade de esporos é necessário; e 3) a sensibilidade do teste deixa a desejar.
- d) **Exame depois de lavagem e sedimentação:** método usado somente para sementes de trevo, leucena e cebola, para detectar *Ditylenchus dipsaci*. As principais limitações do teste são a baixa sensibilidade e a mão de obra.
- e) **Método de lavagem de embrião:** usado, principalmente, para o carvão voador da cevada e do trigo. Uma das limitações deste teste é que a presença do fungo no embrião nem sempre resulta em infecção nas plântulas. Cultivares resistentes podem apresentar este tipo de reação. Além disso, poucos patógenos podem ser detectados por este método.

Métodos com incubação

Estes testes empregam a incubação das sementes sob condições controladas, para permitir o crescimento e a esporulação dos fungos, permitindo a sua identificação, ao nível de espécie.

a) **Método do papel-de-filtro (teste de blotter)**: este método apresenta uma série de vantagens e algumas desvantagens. Dentre as vantagens destacam-se: 1) a combinação dos princípios *in vivo* e *in vitro* que, segundo Neergaard (1979), é uma das maravilhas do teste, uma vez que ele permite “a observação dos fungos que se desenvolvem no hospedeiro *in situ*, sem perturbação, numa condição natural de crescimento”; 2) basicamente, o método do papel-de-filtro é uma combinação da câmara úmida, da fitopatologia, com o teste de germinação, da tecnologia de sementes; e 3) o teste pode ser empregado para todos os tipos de sementes. Como desvantagens, este método apresenta: 1) fungos de crescimento rápido podem encobrir os de desenvolvimento mais lento; 2) o teste não detecta patógenos importantes como *Peronospora manshurica*, *Plasmopara halstedii* e outros parasitas obrigatórios; e 3) a contaminação com saprófitas (*Rhizopus* spp., *Mucor* sp., *Trichoderma* spp., *Cladosporium* spp., entre outros) pode dificultar a análise. Nessas amostras, a desinfestação superficial das sementes com solução de hipoclorito de sódio a 1,05% (Q-bouca a 20%) facilita a leitura.

O método do papel-de-filtro pode ser empregado com algumas variações como: a) adição de 2,4-D (0,1% a 0,2%) na água utilizada para umedecer o papel, visando inibir a germinação das sementes de dicotiledoneas para facilitar a leitura; e, b) o congelamento rápido, introduzido por Limonard, em 1966, apresenta vantagem para sementes de forrageiras e cereais, facilitando a leitura e favorecendo o desenvolvimento de certos fungos [*Fusarium*, *Drechslera* (*Helminthosporium*), *Septoria* e *Phoma*, entre outros]. Porém, para a soja, o congelamento rápido é **inadequado** pois torna a leitura difícil devido à intensa proliferação de bactérias saprófitas. Mais detalhes sobre o método do papel-de-filtro serão fornecidos no item 5, que trata do teste de sanidade para sementes de soja.

b) **Método da placa com ágar**: neste teste, as sementes são desinfestadas

superficialmente numa solução de hipoclorito de sódio a 1,05%, por período de tempo que pode variar de um a 10 minutos, dependendo da cultura. Posteriormente, as sementes são colocadas em placas de Petri contendo meio de cultura. Existem diversos meios de cultura, porém os mais utilizados são o BDA (batata dextrose ágar) com sua variação acídica (ABDA) e o extrato de malte ágar (MEA). Outro meio de cultura muito utilizado para fungos de armazenamento (*Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp.) é o extrato de malte sal (NaCl 18%) e água (MSA). Esses organismos, por serem halofílicos, crescem em meio salino que pode inibir o desenvolvimento dos outros fungos, facilitando assim a leitura.

Outras modificações do teste de ágar são usadas, tornando os meios “seletivos” para determinados organismos. A adição de 2% de PCNB (penta cloro nitro benzeno) ao BDA é aconselhável para restringir o desenvolvimento do micélio de *Macrophomina phaseolina*, tornando, assim, mais fácil a sua quantificação. O método de Magano (Neergaard 1979) é utilizado para *Phoma betae*, em sementes de beterraba.

De modo geral, o método de ágar é utilizado quando o teste em papel-de-filtro não oferece condições adequadas para o crescimento e a esporulação de determinados patógenos ou quando estes produzem colônias características no meio de cultura, sendo, deste modo, identificados macroscopicamente, sem a necessidade do preparo de lâminas.

Algumas desvantagens desses testes incluem os custos dos equipamentos e dos meios de cultura, além de serem mais trabalhosos e requererem laboratórios melhor equipados. Uma outra desvantagem é o fato de que os fungos de crescimento rápido encobrem os de desenvolvimento mais lento, tornando difícil a sua identificação, à semelhança do método do papel-de-filtro.

Métodos de sintoma em plântulas

Ao contrário dos métodos anteriores, que utilizam meios de cultura artificiais, estes testes empregam a semeadura das sementes em solo, areia ou outros substratos semelhantes, previamente autoclavados. A finalidade principal é dar condições para que as plântulas desenvolvam sintomas

semelhantes aos encontrados em condições de campo. Em muitos casos, esses testes são mais adequados para simularem o desempenho de determinados lotes de semente no campo. Alguns dos métodos mais utilizados são discutidos a seguir.

- a) **Teste de Hiltner:** (método do tijolo moído), que é empregado para alguns cereais como o trigo, a cevada e a aveia. As partículas devem ter tamanho médio de 3 a 4 mm para oferecerem boa capilaridade e retenção de umidade. Após o umedecimento, coloca-se uma camada de mais ou menos 8 cm em uma bandeja onde são semeadas 100 sementes distribuídas equidistantemente e cobertas por outra camada de 3 cm de espessura. Após o período de incubação de duas semanas em temperatura ambiente e sem iluminação, faz-se a avaliação das plântulas. O teste permite que as plântulas menos vigorosas sejam infectadas por patógenos transmitidos pela semente, como o *Fusarium nivale* por exemplo, simulando, assim, as condições de campo.
- b) **Teste de emergência em areia:** método muito utilizado na Alemanha para cereais, hortaliças e sementes de essências florestais. No Brasil, o método foi recomendado pelo LANARV (Laboratório Nacional de Referência Vegetal) para lotes de sementes de soja que apresentem altos índices de *Phomopsis* spp. e/ou *Fusarium semitectum* (mais detalhes no item 5).

Além desses, outros testes, utilizando misturas de solos padronizadas e esterilizadas, são empregados para detectar *Drechslera* (*Helminthosporium*), *Fusarium* e *Septoria* em sementes de cereais.

As principais desvantagens desses métodos são o período prolongado de incubação, a mão de obra e o fato de não detectarem os patógenos de final de ciclo. Neste último caso, são necessários os testes que vão além do estágio de plântula. Porém, por serem onerosos e demorados, tais testes não são empregados em análises de rotina.

Testes bioquímicos

A utilização do inóculo presente nas sementes para a inoculação em plantas indicadoras auxilia a identificação de bactérias e vírus. Existem

metodologias refinadas para *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* (em feijão) e *Erwinia stewartii* (em milho). No caso de viroses, apesar do grande número de plantas indicadoras já conhecidas, o teste é pouco usado em análises de rotina, principalmente pela dificuldade na obtenção de plantas indicadoras (Lucca Filho, 1987).

Outro teste também empregado para a detecção de algumas bactérias importantes é o método da placa de lise por bacteriófagos. Apesar de muito utilizado na pesquisa, devido a sua eficiência e alto grau de sensibilidade, este método é pouco usado em análises de rotina. Uma das principais razões é a falta de disponibilidade de bacteriófagos específicos para as bactérias importantes que precisam ser identificadas.

Testes sorológicos

As técnicas de sorologia, que são comumente utilizadas em medicina e veterinária, têm sido recentemente empregadas na fitopatologia para detectar e identificar patógenos, especialmente vírus e bactérias fitopatogênicas. Há pouco mais de duas décadas, a maior parte dos testes para esses patógenos requeriam o uso de plantas indicadoras ou os testes “grow out” que, além de demorados, demandavam muita mão-de-obra. Atualmente, os testes sorológicos abriram novas perspectivas no campo da fitopatologia para a identificação de fungos, vírus e bactérias. As principais vantagens desses testes são rapidez, alta sensibilidade e especificidade. Porém, as desvantagens incluem altos custos, equipamentos sofisticados, qualidade do antisoro e, principalmente, a impossibilidade da distinção entre inóculo viável e inviável. Os principais testes utilizados são discutidos sucintamente a seguir.

a) **Agglutinação:** em cada extremidade de uma lamina de microscópio são colocadas uma gota do extrato (antígeno) da semente a ser avaliada e uma gota do extrato de semente reconhecidamente livre do patógeno (testemunha). A seguir, sobre cada uma delas, é adicionada uma gota do antisoro, observando a reação. A presença do antígeno promove a agglutinação, indicando reação positiva. O método é eficaz para viroses em alta concentração nos tecidos, como o TMV (vírus do mosaico do tabaco).

- b) **Esferas de látex sensibilizadas com gama-globulina:** neste método, minúsculas esferas de látex são sensibilizadas com globulina do antisoro, para facilitar a visualização do precipitado (floculado) formado pela reação positiva entre o antígeno (extrato) e o antisoro. Segundo Lucca Filho (1987), esta técnica tem sido usada para a detecção do vírus do mosaico comum da soja (VMCS), utilizando plúmulas e cotilédones de plântulas.
- c) **Microprecipitação:** método utilizado para testar tanto plântulas quanto sementes. O extrato (antígeno) é obtido de semente ou folha. Em tubo capilar de 1,3 a 1,5 mm de diâmetro por 100 mm de comprimento, são introduzidos o antisoro (aproximadamente 13 mm) e, posteriormente, o antígeno, na mesma quantidade. A mistura dos dois se dá por agitação circular do tubo e a formação de coágulos (microprecipitação) é observada sob microscópio estereoscópico, empregando uma fonte de luz incidente nos tubos.
- d) **Difusão em ágar:** O método pode ser vertical (em tubo de ensaio) ou horizontal (em placa de Petri). Em ambos os casos, a difusão pode ser simples ou dupla, dependendo da maneira com que o antisoro é introduzido.
- d.1) **Difusão simples:** O antígeno é misturado ao ágar e o antisoro (extrato) é adicionado aos tubos (vertical) ou em seis orifícios, na placa de Petri, contendo agar + antisoro (horizontal). No caso da difusão horizontal, a vantagem reside no fato de se poder colocar diferentes diluições do antisoro, em três orifícios e mais as testemunhas (extrato de planta ou semente sadia). A reação positiva é caracterizada pela formação de bandas branco-opacas, horizontais, no tubo-de-ensaio e, em forma de arco, na placa de Petri.
- d.2) **Difusão dupla:** pode ser utilizado extrato de folha de plântula ou da semente. No método vertical (tubo de ensaio), o antígeno é separado do antisoro por uma camada de ágar solidificado. No método horizontal, também conhecido por *Ouchterlony Test*, em placa de Petri contendo ágar previamente solidificado (1 % ágar, 0,85% de cloreto de sódio e 0,02% de azida de sódio), são feitos seis orifícios em torno de um orifício central onde é colocado o antisoro. Nos outros orifícios, são colocados, alternadamente, o extrato do material

(antígeno), em três diluições e o extrato do material sadio (testemunha). Após a incubação, em temperatura ambiente por um ou mais dias, é feita a avaliação. A reação positiva se caracteriza pela formação de uma zona de precipitação, arco branco-opaco.

- e) **Imunofluorescência**: o anticorpo específico é conjugado com um corante fluorescente. O extrato de semente (antígeno) é colocado em placas especiais com alvéolos pequenos. Posteriormente, é adicionado o anticorpo conjugado com o corante. Após a secagem, observar ao microscópio. Uma modificação deste método é a imuno-adsorvente imunofluorescência. Nesse caso, as placas especiais são “codificadas” com o anticorpo (gama-globulina). Após a adição do extrato da semente, somente o patógeno (antígeno) permanece aderido. Posteriormente, adicionar novamente o anticorpo, desta vez conjugado com o corante fluorescente, o qual adere às partículas do patógeno, produzindo fluorescência.
- f) **ELISA - “enzyme linked immunosorbent assay”**: o método apresenta grande sensibilidade para a identificação de patógenos. Para este teste, são utilizadas placas especiais com alvéolos pequenos, os quais são sensibilizados pelo antisoro específico. As placas, após incubação a 37°C e por aproximadamente quatro horas, são enxaguadas com água destilada e os alvéolos preenchidos com o antígeno e incubadas por 16 horas, a 6°C. Novamente as placas são enxugadas e as partículas do antisoro (extrato) conjugadas à enzima são retidas pelo antígeno, fixado às paredes dos alvéolos. Posteriormente, é adicionado o substrato enzimático acrescido de um buffer. O substrato será hidrolizado pela enzima originando uma coloração amarelada que indica a reação positiva entre o antígeno e o antisoro. A sensibilidade do método permite detectar uma semente infectada em uma população de 1.000 sementes sadias.
- g) **Radio-imuno-assay**: este processo vem sendo utilizado pela Universidade Estadual de Iowa, para a quantificação do vírus do mosaico comum da soja (VMCS). Minúsculas esferas são sensibilizadas com o anticorpo específico que irá reter as partículas do vírus presentes no extrato da semente. A seguir, adicionar novamente o anticorpo, desta

feita conjugado com um material radioativo, o qual se fixará às partículas de vírus. A medição da intensidade de radioatividade permite a quantificação do vírus.

Maiores detalhes sobre testes sorológicos poderão ser obtidos na recente publicação de Almeida (1995).

Microscopia eletrônica

Algumas técnicas são hoje utilizadas em microscopia eletrônica. A mais simples consiste na preparação direta, “negative staining”, onde metais pesados são utilizados para produzir uma imagem negativa das partículas de vírus, formando zonas escuras ao redor das mesmas. As vantagens do método se resumem na possibilidade de medição do tamanho das partículas e na possível estimativa da concentração do vírus. Além deste método, pode-se empregar o ISEM - “Immunosorbent Electron Microscopy” ou o SSEM - “Serological Specific Electron Microscopy”, onde antisoros são utilizados para sensibilizar os “grids” (telas), possibilitando a detecção de uma semente infectada em um lote de 1.000 sementes sadias.

Fatores de variação nos testes de incubação

Diversos são os fatores que podem ocasionar variações nos resultados dos testes de sanidade. Dentre os principais destacaremos alguns.

- a) **Amostragem:** a amostra deve ser coletada adequadamente, de acordo com os procedimentos prescritos pelas Regras de Análise de Sementes. A amostra deve ser representativa do lote de sementes, contendo todos os materiais e nas mesmas proporções encontradas no lote.
- b) **Condições de armazenamento das amostras:** o controle da temperatura e da umidade relativa do ar é indispensável para preservar a viabilidade da semente e dos patógenos. A duração e as condições de armazenagem podem levar a resultados completamente diferentes entre laboratórios, devido a perda da viabilidade dos patógenos de cam-

po ou a proliferação de fungos de armazenagem (*Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp.).

- c) **Pré-tratamento:** quando utilizado, o pré-tratamento da amostra deve eliminar somente os fungos saprófitas e não erradicar patógenos importantes. A concentração de hipoclorito de sódio e o tempo de exposição são fatores importantes a serem considerados.
- d) **Número de sementes testadas:** normalmente, o número de sementes necessárias para os testes de sanidade é estabelecido pelas Regras de Análise de Sementes. Esse número pode variar, dependendo da sensibilidade do teste e da importância do patógeno, do ponto de vista epidemiológico. Por exemplo, para o vírus do mosaico da alface (LMV), são testadas 30.000 sementes. O nível de tolerância, neste caso, é de 0,003%. Para algumas brassicas, este número cai para 1.000 sementes. Porém, para a maioria das grandes culturas normalmente testam-se 400 sementes por amostra, de acordo com as regras.
- e) **Espaçamento das sementes no gerbox ou na placa de Petri:** fator importante para evitar a contaminação de sementes sadias pelo inóculo proveniente de sementes infectadas. O espaçamento dependerá do tamanho da semente e da taxa de desenvolvimento do patógeno em relação ao período de incubação.
- f) **Meio de cultura:** para o teste de blotter (papel-de-filtro) este fator tem pouca importância. Porém para os métodos que utilizam meios de cultura (BDA, MEA, etc.) a escolha do meio apropriado é fator primordial para a uniformização dos resultados.
- g) **Temperatura:** é fator importante para o crescimento e a reprodução dos organismos. As temperaturas ótimas, mínimas e máximas para o crescimento e a reprodução (esporulação) variam de acordo com o patógeno. A temperatura ótima para o crescimento do micélio pode ser diferente daquela para a esporulação do mesmo patógeno.
- h) **Conteúdo de umidade:** a quantidade de água deve ser adequada para propiciar a germinação e o desenvolvimento dos patógenos, durante o transcorrer do teste. No teste de blotter (papel-de-filtro), a quantidade de água é regulada pelo número de folhas de papel-de-filtro. O

excesso de água favorece o desenvolvimento de *Alternaria* spp. e bactérias, que podem exercer efeitos antagonísticos sobre outros fungos. A falta de umidade poderá impedir a germinação das sementes ou o desenvolvimento dos microrganismos, afetando drasticamente os resultados do teste.

- i) **Umidade relativa (UR %):** tem pouca importância nos testes normais de incubação, exceto nos testes de sintoma em plântulas.
- j) **Luz:** a qualidade e os ciclos de escuridão/luz são importantes para a esporulação de muitos patógenos. A luz próxima do ultravioleta (NUV), com comprimento de onda de 365 nm, é desejável para a esporulação de alguns patógenos (*Alternaria* spp., em sementes de girassol). Porém, na maioria dos casos, a quantidade de raios ultravioleta presentes na luz branca fluorescente é suficiente para estimular a esporulação da maioria dos patógenos nas sementes.
- l) **Período de incubação:** basicamente, depende da velocidade de crescimento do patógeno, que é influenciada pela temperatura. O período de incubação deve ser adequado para permitir o grau máximo de infecção pelo patógeno.
- m) **Condições de leitura na placa ou no gerbox:** de acordo com a ISTA, uma das maiores fontes de variação nos resultados dos testes de sanidade é o erro humano, devido a fontes de luz deficientes ou microscópios estereoscópicos inadequados. As duas fontes de luz (de preferência fria) devem ser colocadas a uma distância que permita boa iluminação das placas sem aquecer e desidratar as colônias dos fungos. Os microscópios estereoscópicos devem possuir aumentos de 6, 12, 25 e 50 vezes.
- n) **Habilidade e experiência do analista:** em testes de rotina, envolvendo a análise de grande número de amostras, é importante que o analista possua habilidade para reconhecer e identificar os patógenos, mesmo em estádios iniciais de desenvolvimento. Analistas com pouca experiência freqüentemente confundem patógenos importantes com saprófitas (exemplo: *Colletotrichum truncatum* com *Chaetomium* sp., em sementes de soja).

II. Soja - Patologia e tratamento de sementes

Introdução

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é atacada por um grande número de doenças fúngicas e algumas bacterianas, além de viroses e nematóides. Dentre estas, as doenças causadas por fungos são consideradas muito importantes, não somente devido ao maior número, mas pelos prejuízos causados, tanto no rendimento quanto na qualidade das sementes. Além disso, muitos desses microrganismos têm, na semente, o seu principal veículo de disseminação e de introdução em novas áreas de cultivo, onde, sob condições favoráveis de ambiente, poderão causar sérios danos à cultura.

No Brasil, com a expansão da cultura da soja para as regiões Central e Norte, os problemas para a produção de sementes de alta qualidade têm aumentado. A ocorrência de condições climáticas desfavoráveis, como chuvas e altas temperaturas durante as fases de maturação e colheita, afeta, além da qualidade fisiológica, a sanidade das sementes.

Até o presente, foram identificados inúmeros microrganismos em sementes de soja, porém, poucos são os que merecem destaque por serem economicamente importantes. A Tabela 2 cita os patógenos (ou saprófitas) comumente encontrados nas sementes; porém, além desses, outros fungos podem ocasionalmente aparecer nas sementes. Todavia, não existe evidência suficientemente documentada de que os mesmos são comuns ou causam doenças nessa leguminosa. Patógenos importantes como *Phakopsora pachyrhizi* (ferrugem) e *Erysiphe diffusa* (oídio), não são transmitidos por sementes.

Análise sanitária de sementes de soja

O principal método utilizado na análise de sementes de soja é o do papel-

Tabela 2. Principais patógenos (ou saprófitas) comumente associados com sementes de soja.

Fungos	
<i>Alternaria</i> ¹	<i>Mucor</i> ¹
<i>Aspergillus</i> ²	<i>Myrothecium roridum</i> ³
<i>Botryodiplodia</i> ³	<i>Nematospora coryli</i> ³
<i>Botrytis</i> ¹	<i>Penicillium</i> ¹
<i>Cephalosporium</i> ¹	<i>Periconia</i> ¹
<i>Cercospora sojae</i> ³	<i>Peronospora manshurica</i> ³
<i>Cercospora kikuchii</i> ³	<i>Phialophora gregata</i> ⁴
<i>Chaetomium</i> ¹	<i>Phomopsis</i> ³
<i>Cladosporium</i> ¹	<i>Phoma</i> ¹
<i>Colletotrichum</i> ¹	<i>Phyllosticta</i> ⁴
<i>C. dematium</i> var. <i>truncata</i> ³	<i>Phytophthora megasperma</i> ⁴
<i>Corynespora</i> ¹	<i>Pithomyces</i> ¹
<i>C. cassiicola</i> ³	<i>Rhizoctonia solani</i> ³
<i>Curvularia</i> ¹	<i>Rhizopus</i> ¹
<i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>caulivora</i> ⁴	<i>Septoria glycines</i> ^{3,4}
<i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>sojae</i> ⁴	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ³
<i>Drechslera</i> (<i>Helminthosporium</i>) ¹	<i>Sclerotium rolfsii</i> ³
<i>Epicoccum</i> ¹	<i>Stemphylium</i> ¹
<i>Fusarium</i> ³	<i>Trichoderma</i> ¹
<i>Gliocadium</i> ¹	<i>Trichothecium</i> ¹
<i>Glomerella glycines</i> ³	<i>Ulocladium</i> ¹
<i>Macrophomina phaseolina</i> ³	<i>Verticillium</i> ¹
<i>Monilia</i> ¹	
Bactérias	
<i>Bacillus subtilis</i> ⁴	<i>Pseudomonas tabaci</i> ³
<i>Corynebacterium flaccumfaciens</i> ⁴	<i>Xanthomonas glycines</i> ³
<i>Pseudomonas solonacearum</i> ⁴	
Vírus	
Vírus do mosaico comum da soja (SMV) ³	
Vírus da necrose anelar do fumo (Tobacco Ringspot Vírus-TRV)	
Vírus da necrose branca do fumo (Tobacco Streak Virus-TSV)	
Nematóides	
<i>Heterodera glycines</i> ³ (torrões de solo misturados às sementes) ⁴	
¹ Contaminantes e/ou saprófitas; ² <i>Aspergillus</i> : importante fungo de armazenagem; ³ Patógenos comumente causadores de doença em soja; ⁴ Relatos no exterior (Richardson, 1979, 1981)	

de-filtro (*Blotter*). A experiência tem comprovado que este método é perfeitamente viável, sendo o mais eficaz para a cultura. Em casos específicos, o método pode ser alterado, variando a temperatura e o período de incubação, para detectar patógenos como *Sclerotinia sclerotiorum* (mofo branco).

Para a execução do teste, as caixas plásticas (gerbox) podem ser utilizadas por muito tempo, bastando que as mesmas sejam lavadas com detergente, após cada uso, enxaguadas e secas. Antes da utilização, as mesmas devem ser desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1,05% (Q-Boa a 20%).

O papel-de-filtro (80g/m²) deve ser cortado em folhas de 10,5 cm x 10,5 cm, acondicionado em sacos de papel e esterilizado em estufa a 160°C, por 20 minutos. Após esse período, aguardar o resfriamento da estufa antes de abri-la.

Para a montagem, colocar quatro folhas de papel-de-filtro em cada gerbox previamente esterilizado e adicionar água (autoclavada de preferência), suficiente para umedecer o papel, (evitar excessos que favorecem a ocorrência de bactérias e *Alternaria* spp.).

Posteriormente, tomar, aleatoriamente, 20 sementes que são dispostas no gerbox, na forma de 5 x 4. Montar 20 gerbox (total de 400 sementes) por amostra. Após a montagem, o material deve ser mantido em incubação por sete dias a 20±2°C (Brasil, 1992). A Avaliação é feita em cada semente, sendo anotada, em ficha apropriada a ocorrência dos diversos patógenos. *Aspergillus flavus* e *Penicillium* spp., apesar de considerados saprófitas por alguns autores, devem ser contados por serem fungos de armazenagem, responsáveis pela completa deterioração das sementes, quando as condições de armazenagem são inadequadas (umidade e temperatura elevadas).

Vale ressaltar que a luz não é fator limitante nos testes de sanidade de sementes de soja. Bons resultados são obtidos com luz branca fluorescente ou mesmo com luz natural. Todavia, laboratórios credenciados pelo LANARV/MAPA deverão seguir as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992) empregando ciclos alternados de 12 h de luz e 12 h de escuridão.

Doenças na cultura e patógenos importantes nas sementes

Queima da haste e da vagem - *Phomopsis* sp.

Esta doença ocorre naturalmente na maioria das lavouras de soja, sem causar sérios prejuízos ao rendimento. Porém, pode reduzir a qualidade das sementes, especialmente quando ocorrem períodos chuvosos associados com altas temperaturas durante a fase de maturação. Os sintomas da doença na planta aparecem durante a fase final do ciclo, sendo caracterizados por pontuações pretas (picnídios), que são formados linearmente na haste e pecíolos e, ao acaso, sobre as vagens. As sementes infectadas, após o período de incubação apresentam normalmente o micélio branco, compacto, sob o qual aparecem os picnídios. Não raramente, *Phomopsis* sp. apresenta apenas picnídios sobre a semente. Nesses casos, a identificação segura deve ser feita com o auxílio do microscópio biológico, usando-se aumentos de até 400 vezes, para observar a presença dos esporos alfa e beta. Muitas vezes, ambos os tipos de esporos são produzidos no mesmo picnídio (característica da espécie), porém, algumas vezes, são produzidos apenas alfa ou beta num picnídio. O fungo torna o teste padrão de germinação (rolo de papel, 25°C) inviável em lotes de sementes com altos índices de infecção. Todavia, o mesmo não afeta a germinação em areia ou a emergência de plântulas no solo, quando a semente possui boa qualidade fisiológica. Por essa razão, deve-se, em tais circunstâncias, substituir o teste padrão de germinação pelo de germinação em areia ou pelo teste de tetrazólio, que em conjunto com o teste de sanidade, fornece um diagnóstico completo da qualidade da semente (Figura 1).

Durante a armazenagem em condição ambiente, *Phomopsis* sp. perde viabilidade rapidamente, ocorrendo, ao mesmo tempo, um aumento gradual na porcentagem de germinação em laboratório (Figura 2). Este “aumento” na germinação depende também da qualidade fisiológica da semente. Danos mecânicos, deterioração por umidade e danos por percevejo, são freqüentemente, responsáveis pela baixa qualidade da semente e, não raramente, estão associados com *Phomopsis* sp. Nesses casos, mesmo que o fungo tenha perdido sua viabilidade durante a armazena-



Figura 1. DIACOM: diagnóstico completo (patologia + tetrazólio)

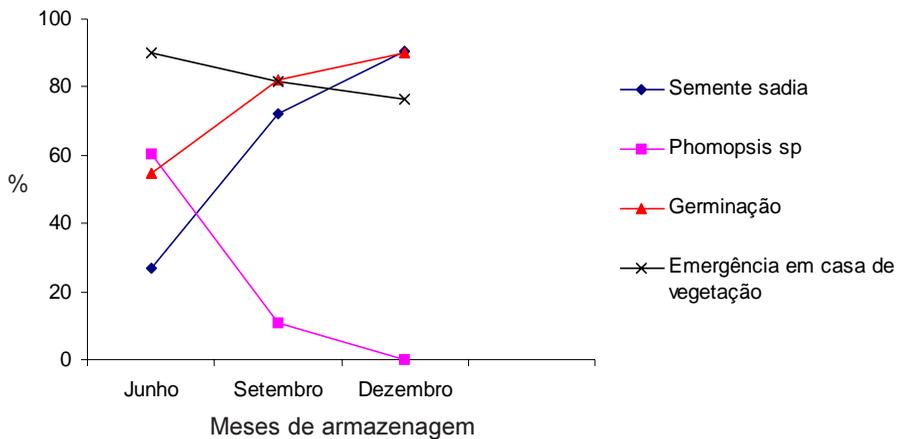


Figura 2. Efeito do período de armazenagem sobre o índice de sementes infectadas por *Phomopsis* sp. e a qualidade fisiológica de sementes de soja “Paraná”. Embrapa Soja. Londrina, PR. 1981

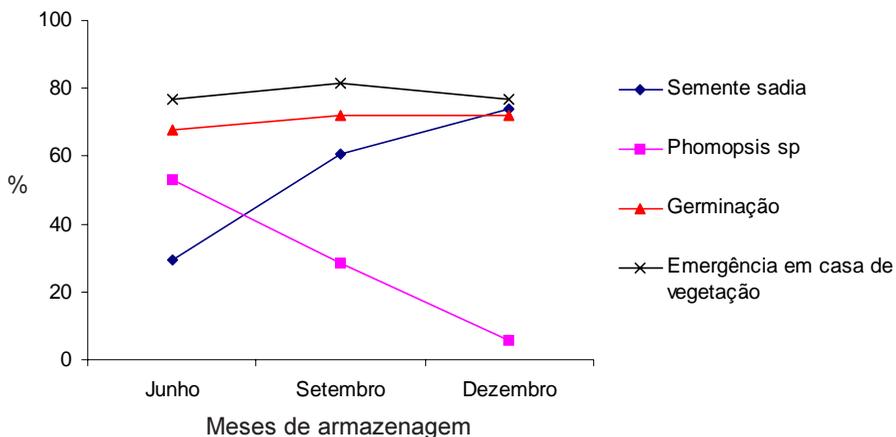


Figura 3. Efeito do período de armazenagem sobre o índice de sementes infectadas por *Phomopsis* sp. e a qualidade fisiológica de sementes de soja 'Bossier'. Embrapa Soja

gem a germinação poderá não alcançar o padrão mínimo necessário para sua comercialização (Figura 3).

Cancro da haste - *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (*Phomopsis meridionalis*) - Morgan-Jones

O cancro da haste (Figura 4) foi constatado pela primeira vez na safra 1988/1989 no Sul do Paraná e em uma pequena área em Mato Grosso. Sua disseminação foi bastante rápida, sendo encontrado na safra seguinte, em todas as regiões produtoras de soja do país sendo que na safra 1991/1992, milhares de hectares de soja dos Estados do Paraná, Santa Catarina e, inclusive, do Paraguai, foram dizimados pelo cancro da haste.

A taxa de transmissão do fungo pela semente (Figura 5) é bastante baixa porém, se as sementes não forem tratadas com fungicidas adequados (Tabela 2), o fungo pode ser introduzido em áreas antes livres do patógeno. As poucas plantas infectadas no primeiro ano multiplicarão o inóculo podendo resultar em grandes perdas na safra seguinte se a cultivar for suscetível e as condições climáticas forem favoráveis, período chuvoso nos primeiros 30-40 dias após a emergência das plântulas.

Foto: José Tadashi Yorinori



Figura 4. Cancro da haste da qualidade da semente

Foto: José Tadashi Yorinori

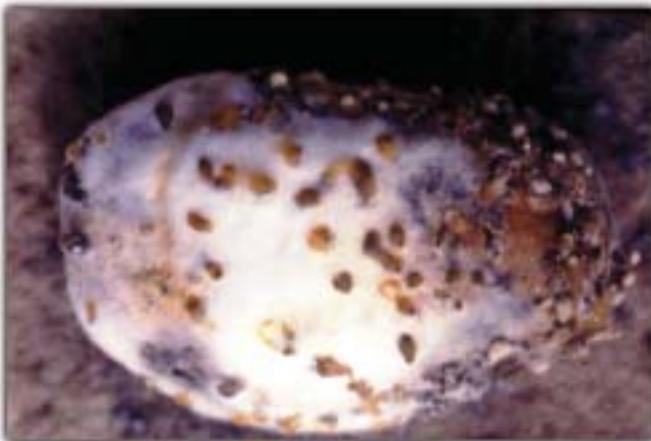


Figura 5. Agente do cancro da haste (Dpm) em sementes

Antracnose - *Colletotrichum dematium* (Pers. ex. fr.) Grove var. *truncata* (Schw.) - Von Arx.

A antracnose, causada por *C. dematium* var. *truncata* (*C. truncatum*), foi responsável por sérios prejuízos às lavouras de soja, especialmente na região do Cerrado. Os sintomas desta doença podem ser observados visualmente, desde as fases iniciais de desenvolvimento da planta, ocasionando lesões nos cotilédones (Figura 6), na haste e nos ramos, os quais após secarem ficam tomados por pontuações escuras, os acérvulos, onde são observadas inúmeras setas escuras, que é também a característica utilizada para a identificação do patógeno nas sementes, após o período de incubação. O fungo pode causar deterioração da semente, morte de plântulas e infecção sistêmica em plantas adultas.

Com a expansão da cultura para a região do Brasil central, em algumas safras, tem sido observado um aumento na ocorrência de *C. truncatum* em sementes de soja principalmente quando ocorre atraso na colheita, devido a chuvas, especialmente em lavouras com população excessiva de plantas. De modo geral, o uso extensivo do tratamento de sementes com fungicidas, a melhor qualidade da semente e o desenvolvimento de cultivares mais adaptados à região, fizeram com que a importância da antracnose e do fungo na semente diminuísse.

Foto: Ademir Assis Hemming



Figura 6. Plântula com *C. truncatum* no cotilédone

Mancha Púrpura - *Cercospora kikuchii* (Matsu & Tomoy) Gardner

Embora o sintoma característico causado por *C. kikuchii* na semente seja a mancha-púrpura (Figura 7), nem todas as sementes infectadas apresentam esta coloração do tegumento. O fungo pode também atacar as vagens, hastes e pecíolos, causando manchas castanho-avermelhadas, e as folhas, causando crestamento foliar. A fase de crestamento foliar, que provoca a desfolha prematura e ocorre simultaneamente com *Septoria glycines* (doenças de final de ciclo), pode causar redução da produtividade. Apesar de ser o fungo mais freqüente em sementes de soja, no Brasil, trabalhos conduzidos pela Embrapa Soja, não demonstraram efeito negativo do fungo sobre a qualidade da semente, em ensaios conduzidos no Estado do Paraná. Sementes de soja dos cultivares Paraná, Davis e Bossier, com 0, 5, 10, 20 e 40% de mancha-púrpura não diferiram entre si com relação à germinação (25°C rolo de papel), emergência a campo e rendimento. O maior índice de infecção por *C. kikuchii* observado na semente colhida foi de 2,12%, indicando que, nas condições em que o estudo foi realizado, a taxa de transmissão semente-planta-semente foi bastante baixa. Por esse motivo, o padrão de tolerância de sementes com mancha púrpura, antes exigido por lei, foi retirado pelo SNPC/SARC/MAPA.

Foto: Ademir Assis Henning



Figura 7. Mancha púrpura em sementes (*C. kikuchii*)

O tratamento das sementes com fungicidas sistêmicos (Tabela 3), pode ser adotado como medida preventiva na disseminação do patógeno para novas áreas, onde sob condições adequadas de temperatura e umidade, poderá causar severos danos à soja e permanecer viável nos restos de cultura.

Mancha “olho-de-rã” - *Cercospora sojina* Hara

Nas folhas, o sintoma mais característico da doença é a presença de lesões castanho-cinza claro com bordas avermelhadas, as quais aparecem próximo à fase de floração. O fungo pode atacar também as hastes, vagens e as sementes. Nas hastes, as lesões são alongadas, com bordas pardas, as quais são mais evidentes no final do ciclo. As sementes infectadas podem possuir coloração cinza esverdeada no tegumento que, freqüentemente, apresenta rachaduras. A utilização de cultivares resistentes à doença tornou esporádica a presença do patógeno em lotes comerciais de semente. Para reduzir a possibilidade de transmissão e introdução de novas raças do patógeno em novas áreas de cultivo, o tratamento da semente (Tabela 3) é recomendado.

Podridão negra das raízes - *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid

A doença ocorre com bastante freqüência e pode causar prejuízos, em condição de clima seco. Este problema pode ser agravado em lavouras onde o preparo do solo não é adequado, permitindo a formação do pé-de-grade e, conseqüentemente, as plantas desenvolvem sistema radicular mais superficial, não suportando veranicos. A transmissão por semente, embora ocorra, não é importante, uma vez que o inóculo existe na maioria dos solos.

As plantas atacadas no campo apresentam deterioração do sistema radicular, com formação intensa de microesclerócios sob a epiderme, os quais matam as plantas prematuramente (Figura 8). Na semente, após o período de incubação em gerbox, o fungo normalmente apresenta forma-

Tabela 3. Fungicidas e respectivas doses, para o tratamento de sementes de soja. XXVII Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil. Cornélio Procópio, PR. Agosto/2005.

Nome comum • Produto comercial ²	Dose/100 kg de semente ¹ Ingrediente ativo (gramas) • Produto comercial (g ou ml)
I. Fungicidas de contato	
Captan • Captan 750 TS	90 g • 120 g
Thiram • Rhodiauran 500 SC • Thiram 480 TS	70 g (SC) ou 144 g (TS) • 140 ml • 300 ml
Tolyfluanid • Euparen M 500 PM	50 g • 100 g
II. Fungicidas sistêmicos	
Carbendazin • Derosal 500 SC	30 g • 60 ml
Carbendazin + Thiram • Derosal Plus ⁴	30 g + 70 g • 200 ml
Carbendazin + Thiram • Protreat ⁴	30 g + 70 g • 200 ml
Carboxin + Thiram • Vitavax + Thiram PM ⁴ • Vitavax + Thiram 200 SC ^{3,4}	75 g + 75 g ou 50 + 50 g • 200 g • 250 ml
Difeconazole • Spectro	5 g • 33 ml
Fludioxonil + Metalaxyl – M • Maxim XL ⁴	35 g + 10 g • 100 ml
Thiabendazole • Tecto 100 (PM e SC)	17 g • 170 g ou 31 ml
Thiabendazole + Thiram • Tegram ⁴	17 g + 70 g • 200 ml
Tiofanato metílico • Cercobin 700 PM • Cercobin 500 SC • Topsin 500 SC	70 g • 100 g • 140 ml • 140 ml

¹ As doses dos produtos isolados são aquelas para a aplicação sequencial (fungicida de contato e sistêmico). Caso contrário utilizar a dose do rótulo.

² Poderão ser utilizadas outras marcas comerciais, desde que sejam mantidos a dose do ingrediente ativo e o tipo de formulação.

³ Fazer o tratamento com pré-diluição, na proporção de 250 ml do produto + 250 ml de água para 100 kg de semente.

⁴ Misturas formuladas comercialmente e registradas no MAPA/DDIV/SDA.

CUIDADOS: devem ser tomadas precauções na manipulação dos fungicidas, seguindo as orientações da bula dos produtos.

Foto: Ademir Assis Henning



Figura 8. Sintoma de *Macrophomina phaseolina* na raiz (presença de microscleródios).

ção de micélio escuro com abundante produção de microsclerócios pretos sobre a semente mas, que podem espalhar-se sobre o papel-de-filtro. Esta característica permite a identificação do patógeno com bastante segurança, mesmo a olho nu (Figura 9).

Foto: Ademir Assis Henning



Figura 9. Microscleródios de *M. phaseolina* sobre o papel-de-filtro - semente infectada.

Tombamento e morte e reboleira - *Rhizoctonia solani* (Kuhn)

Este fungo pode causar doença tanto na fase de plântula (tombamento) quanto na fase adulta (morte em reboleira), durante o período de floração. Os sintomas nas plântulas são caracterizados por lesões marrom-avermelhadas, na região do colo (Figura 10). A doença pode ocorrer também em plantas adultas, principalmente em áreas recém desmatadas onde as reboleiras (Figura 11) começam a aparecer aproximadamente durante a fase de floração com o amarelecimento das folhas, clorose ao longo das nervuras, murchamento das folhas jovens e broto apical. Finalmente, ocorre murcha e morte das plantas, que retêm os pecíolos voltados para baixo. O fungo é um habitante do solo, permanecendo viável em restos de cultura. Em algumas regiões do sul, em áreas novas de cultivo, têm sido relatadas severas perdas em lavouras, porém, de modo geral, após dois ou três anos de cultivo, a incidência da doença diminui tendendo a desaparecer na maioria dos casos. A taxa de transmissão do fungo por semente é baixa e sua importância é questionável, já que o mesmo ocorre naturalmente nos solos. A identificação do fungo no teste de sanidade de semente é feita com base na característica do micélio marrom, onde as hifas septadas possuem ramificação em 90°C, já que o mesmo não produz esporos.



Foto: Ademir Assis Henning

Figura 10. Tombamento por *Rhizoctonia solani*

Foto: Ademir Assis Henning



Figura 11. Morte em reboleira *R. solani*, área nova em Canoinhas, SC

Podridão branca da haste e da vagem - *Sclerotinia sclerotiorum* Lib. (De Bary)

A doença pode causar severas perdas em anos chuvosos e com temperaturas amenas em algumas regiões do sul do Paraná e Minas Gerais. As plantas atacadas apresentam o micélio branco, algodonos, que se desenvolve sobre a haste e ramos da soja, onde, posteriormente, são formados os esclerócios (Figura 12). Tais estruturas de resistência podem igualmente ser produzidas no interior da haste, adquirindo a forma cilíndrica. Durante a colheita, os esclerócios são misturados às sementes e espalhados no solo, onde podem permanecer viáveis por vários anos.

A transmissão por semente pode ocorrer tanto através de micélio dormente (interno) como esclerócios misturados às sementes. A chance da transmissão do fungo através de esclerócios misturados às sementes pode ser reduzida, ou praticamente eliminada, durante o beneficiamento da semente pelo emprego do separador espiral seguido da mesa de gravidade. Quanto à transmissão por micélio dormente, ainda que a taxa seja bastante baixa num lote de semente, a sua importância reside na possibilidade de introdução do inóculo em novas áreas de cultivo. O fungo, devido à formação de estruturas de resistência (esclerócios), é de difícil



Figura 12. Mofo branco em hastes

erradicação após introduzido numa área. O tratamento de sementes com os fungicidas do grupo dos benzimidazóis (Tabela 3), poderá ser adotado como medida de segurança para reduzir tal risco.

Fusarioses - *Fusarium semitectum* (Berk. & Rav.)

Diversas espécies de *Fusarium* têm sido relatadas, porém, em nossas condições, *Fusarium semitectum* é o mais comum em sementes de soja. Este fungo, considerado por alguns autores como parasita fraco ou saprófita, foi propositadamente incluído entre os fungos fitopatogênicos, por causar problemas de germinação em laboratório, de maneira semelhante ao *Phomopsis* sp (Figura 13). O fungo está comumente associado às sementes que sofreram atraso de colheita ou deterioração por umidade no campo. *Fusarium semitectum*, apesar de isolado de cotilédones de

Foto: Ademir Assis Henning



Figura 13. *Fusarium semitectum*

plântulas anormais, oriundas de sementes naturalmente infectadas, não produziu nenhum sintoma de doença, quando inoculado em plantas de soja e girassol, em casa-de-vegetação.

O sintoma típico de *Fusarium semitectum* em sementes de soja, após o período de incubação, é a presença de micélio normalmente branco, porém variando do amarelo-pêssego até o marrom (dependendo da idade da cultura) e com aspecto algodonosos e denso. Outras espécies fitopatogênicas de fusarium como: *Fusarium solani* (causa da síndrome da morte súbita (SDS) ou podridão vermelha das raízes (PVR) (Figura 14) e *Fusarium oxysporum* (podridão de sementes e morte de plântulas), são fungos de ocorrência esporádica em sementes de soja.

Além desses patógenos, outros como *Myrothecium roridum* (mancha-de-mirotécio), *Corynespora cassicola* (mancha-alvo e podridão radicular) e

Foto: Ademir Assis Henning



Figura 14. Podridão vermelha da raiz

Sclerotium rolfsii (murcha-de-esclerócio), podem eventualmente ocorrer nas sementes.

Tratamento de sementes

A rápida expansão da cultura da soja, nas últimas três décadas, quase sempre feita sem o mínimo cuidado fitossanitário, permitiu que a maioria dos patógenos fosse disseminada a todas as regiões produtoras, através da semente, seu principal veículo de disseminação e introdução em novas áreas de cultivo.

Na cultura da soja, a obtenção de uma lavoura com população adequada de plantas depende da correta utilização de diversas práticas. O bom preparo do solo, a semeadura na época adequada, em solo com boa dispo-

nibilidade hídrica, a utilização correta de herbicidas e a boa regulagem da semeadora (densidade e profundidade) são práticas essenciais, estando o seu sucesso condicionado à utilização de sementes de boa qualidade. Todavia, freqüentemente, **a semeadura não é realizada em condições ideais, o que resulta em sérios problemas na emergência da soja, havendo, muitas vezes, a necessidade de ressemeadura.** Em tais circunstâncias, o tratamento da semente com fungicidas (sistêmico e contato) oferece garantia adicional ao estabelecimento da lavoura a custos reduzidos (menos de 0,5% do custo de instalação da lavoura).

O tratamento de sementes, com fungicidas, é uma prática que vem sendo utilizada por um número cada vez maior de sojicultores. “O volume de sementes tratadas com fungicidas, que, na safra 1991/92, não atingia 5% da área semeada, passou para 93% na safra 2001/02”.^{**} Além de controlar patógenos importantes transmitidos pela semente, o tratamento de sementes é uma prática eficiente para assegurar populações adequadas de plantas, quando as condições edafoclimáticas durante a semeadura são desfavoráveis à germinação e à rápida emergência da soja, deixando a semente exposta por mais tempo a fungos habitantes do solo como: *Rhizoctonia solani.*, *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp. (*A. flavus*) e *Pythium* spp. (principalmente no sul) que, entre outros, podem causar a sua deterioração no solo ou a morte de plântulas.

Como tratar a semente

A função dos fungicidas de contato é proteger a semente contra fungos do solo e dos fungicidas sistêmicos, principalmente do grupo dos benzimidazóis, é controlar fitopatógenos presentes nas sementes. Desse modo é importante que os fungicidas estejam em contato direto com a semente. O tratamento de semente com fungicidas, a aplicação de micronutrientes (cobalto e molibdênio) e a inoculação podem ser feitos

^{**} Conforme informado pelo Engenheiro Agrônomo Antonio Carlos Roessing e o Economista Heveraldo Camargo Mello, no Seminário Interno da Embrapa Soja - Sistemas de Produção de Soja no Brasil em 30.08.02.

de forma seqüencial, com máquinas específicas de tratar sementes, desde que essas disponham de tanques separados para os produtos, uma vez que foi proibida a mistura de agrotóxicos em tanque (Instrução Normativa Nº 46/2002 de 24 de julho de 2002, que revoga a portaria SDA Nº 67 de 30 de maio de 1995).

Tratamento utilizando máquinas de tratar sementes

Dentre as diversas vantagens que essas máquinas apresentam em relação ao tratamento convencional (tambor) destacam-se:

- a) menor risco de intoxicação dos operadores, uma vez que os fungicidas são utilizados via líquida;
- b) melhores cobertura e aderência dos fungicidas, micronutrientes e do inoculante às sementes;
- c) rendimento em torno de 60 a 70 sacos por hora; e
- d) maior facilidade operacional já que o equipamento pode ser levado ao campo, pois possui engate para a tomada de força do trator.

Obs.: existem hoje no mercado máquinas para tratamento industrial, com capacidade de até 12-13 toneladas/hora.

Atenção!!

O produtor deve tomar cuidado ao adquirir os fungicidas, micronutrientes e inoculantes, optando por formulações líquidas ou pó que possibilitem que o volume final da calda não ultrapasse a 300 mL/50 kg de sementes.

Referências

FERREIRA, L.P.; LEHMAN, P.S.; ALMEIDA, A.M.R. **Doenças da soja no Brasil**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1979. 41p. (EMBRAPA-CNPSO. Circular Técnica, 1).

FRANÇA NETO, J. de B.; COSTA, N.P. da; HENNING, A.A.; ALMEIDA, A.M.R.; BARRETO, J.N. Efeito da aplicação de fungicidas foliares, sobre a maturação fisiológica de sementes de soja. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 2, 1984, Campinas. **Resumos...** Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1984a. p.136.

FRANÇA NETO, J. de B.; HENNING, A.A. **Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1984b. 39p. (EMBRAPA-CNPSO. Circular Técnica, 9).

FRANÇA NETO, J. de B.; HENNING, A.A. **DIACOM**: diagnóstico completo da qualidade da semente de soja. EMBRAPA-CNPSO, 1992. 22 p. (EMBRAPA-CNPSO, Circular Técnica, 10).

HENNING, A.A. **Patologia de sementes**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1996. 43 p. (EMBRAPA-CNPSO, Documentos, 90).

HENNING, A.A.; FRANÇA NETO, J. de B. Problemas na avaliação de germinação de sementes de soja com alta incidência de *Phomopsis* sp. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.2, n.5, p.9-22, 1980.

HENNING, A.A.; FRANÇA NETO, J. de B. Effect of *Phomopsis* spp. on soybean seed quality in Brazil. In: CONFERENCE ON THE DIAPORTHE / DIAPORTHE DISEASE COMPLEX OF SOYBEAN, 1984, Fort Walton Beach. **Proceedings...** Springfield, 1984. p.66-7.

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

HENNING, A.A.; FRANÇA NETO, J. de B.; COSTA, N.P. da. **Recomendações de fungicidas para o tratamento de sementes de soja**. Londri-

na: EMBRAPA-CNPSo, 1984. 4p. (EMBRAPA-CNPSo. Comunicado Técnico, 31).

HENNING, A.A.; FRANÇA NETO, J. de B. Control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary and *Alternaria* spp., in sunflower seeds. In: INTERNATIONAL SUNFLOWER CONFERENCE, 11., Mar del Plata. **Proceedings...** Mar del Plata, 1985. p.475-478.

HENNING, A.A.; MATSUDA, J.M. Efeito do ambiente e do período de armazenamento sobre a viabilidade de *Colletotrichum truncatum* em sementes de soja. **Informativo ABRATES**, v.3, n.3, p.101, 1993. Edição de Resumos do VIII Congresso Brasileiro de Sementes, Foz do Iguaçu, ago. 1993.

HENNING, A.A.; CATELLAN, A.J.; KRZYZANOWSKI, F.C.; FRANÇA NETO, J. de B. **Tratamento e inoculação de sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1994. 4p. (EMBRAPA-CNPSo. Comunicado Técnico, 54)

NEEGAARD, P. **Seed pathology**. 2ed. London: McMillan Press, 1979. 2v.

RICHARDSON, M.J. **An annotated list of seed-borne diseases**. 3ed. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1979. 320p.

RICHARDSON, M.J. **Supplement to an annotated list of seed-borne diseases**. 3ed. Zurich: International Seed Testing Association, 1981. 78p.

SINCLAIR, J.B.; BACKMAN, P.A. (Ed.). **Compendium of soybean diseases**. 3ed. St. Paul: APS Press, 1989. 106 p.

WALTERS, H.J. Purple seed stain and *Cercospora* leaf blight caused by *Cercospora kikuchii*. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 3., 1984, Iowa. **Program and Abstract**. Ames: Iowa State University, 1984. p.5.

WALTERS, H.J. Soybean leaf blight caused by *Cercospora kikuchii*. **Plant Disease**, St. Paul, v.64, p.961-962, 1980.

WILCOX, J.R.; ABNEY, T.S. Effects of *Cercospora kikuchii* on soybeans. **Phytopathology**, St. Paul, v.63, 796-797, 1973.

YORINORI, J.T. Avaliação de danos causados por *Septoria glycines* em cultivares de soja. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Resultados de pesquisa de soja 1982/83**. Londrina: 1983. p.213-221

YORINORI, J.T. Tratamento de sementes de soja para controle da disseminação de *Cercospora sojina* Hara (mancha olho-de-rã). In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 3., 1984, Campinas. **Resumos...** Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1984. p.33.

YORINORI, J.T. **Cancro da haste da soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1990. 8p. (EMBRAPA-CNPSO. Comunicado Técnico, 44).