

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE GUANDU PARA
RESISTÊNCIA A *Macrophomina phaseolina* E
ESPORULAÇÃO DO FUNGO**

Janicéli Rosa

**Orientadores: Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Panizzi
Dr. Rodolfo Godoy**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal).

Jaboticabal - São Paulo - Brasil

Maio de 2006

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JANICÉLI ROSA – filha de João Batista Aparecido da Rosa e Maria Martha da Silva Rosa, nascida na cidade de Monte Alegre do Sul, no Estado de São Paulo, em 4 de março de 1978. Concluiu o 2º Grau em Holambra (SP) pelo Colégio Van Gogh – Unidade Anglo Holambra, em dezembro de 1997. Em fevereiro de 1998 iniciou o curso de graduação em Agronomia na FCAV – UNESP/Jaboticabal, obtendo o título de Engenheiro Agrônomo em julho de 2003. Em agosto de 2003 iniciou o curso de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) curso de Mestrado na FCAV – UNESP/Jaboticabal. Em fevereiro de 2005 foi contratada pela Universidade Camilo Castelo Branco – UNICASTELO – Câmpus Fernandópolis para ministrar as disciplinas de Fitopatologia Geral e Doenças das Plantas Cultivadas.

OFEREÇO

Aos meus pais João e Martha por todo apoio, carinho, compreensão, amor e principalmente por me dar condições para seguir adiante e cumprir mais uma etapa da vida.

DEDICO

Às minhas irmãs Janaina e Jamira por tudo que vivemos juntas até hoje e por todo apoio, amizade, amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*À Profa. Dra. Rita de Cássia Panizzi pela
compreensão, paciência, orientação e
principalmente pela amizade, me ajudando a
vencer mais essa etapa da vida.*

*Ao meu namorado Rodrigo Luiz Cavarianni,
companheiro de todas as horas, obrigada
principalmente pela paciência.*

*À Deus, pela minha vida e saúde para seguir em
frente.*

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, pela acolhida durante todos esses anos e pelas condições oferecidas e pela oportunidade que me foi dada para a realização do curso.

Aos membros da Banca Examinadora pela atenção e pelas valiosas sugestões que só enriqueceram o trabalho.

A CNPq pela concessão de bolsa de estudo durante certo período do curso.

Ao Dr. Rodolfo Godoy pela co-orientação e à Embrapa Pecuária Sudeste por ceder os materiais necessários para a realização desse trabalho.

Às amigas de república Luciana Souza (Patóta), Fernanda da Silva (Pólen) e Geisa Mesquita (Picanha), o meu muito obrigada pelo apoio, companheirismo, amizade e principalmente pelos momentos de descontração tão importantes que passamos juntas.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade, em especial a Sra. Rosângela dos Santos e Sr. Wanderley Brasil por toda ajuda e dedicação em todas as etapas do trabalho e principalmente pela amizade.

Ao Prof. Dr. Arthur Bernardes Cecílio Filho pela amizade, apoio e preocupação durante todo o período de duração do curso.

À Família Aguillar que me recebeu com muito carinho sempre que precisei.

À UNICASTELO - Câmpus Fernandópolis, que me proporcionou a oportunidade de por em prática tudo que aprendi até agora.

Muito obrigado a todos aqueles que de maneira direta ou indireta colaboraram para a realização desse sonho.

“ Todos os dias Deus nos dá um momento em que é possível mudar tudo que nos deixa infelizes. O instante mágico é o momento que um SIM ou um NÃO pode mudar toda nossa existência.”
(Paulo Coelho)

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais	01
1. A cultura do guandu	01
2. O patógeno <i>Macrophomina phaseolina</i>	02
3. A Podridão Cinzenta do Caule	03
4. Controle da Podridão Cinzenta do Caule	04
5. Referências	07
CAPÍTULO 2 – Ajuste de metodologia para inoculação artificial de sementes de guandu com <i>Macrophomina phaseolina</i>	12
Resumo	12
Palavras-chave	13
Abstract	14
Keywords	14
Introdução	15
Material e Métodos	16
Resultados e Discussão	17
Conclusões	22
Referências	23
CAPÍTULO 3 – Seleção de genótipos de guandu para resistência a <i>Macrophomina phaseolina</i>	25
Resumo	25
Palavras-chave	25
Abstract	26
Keywords	26
Introdução	27
Material e Métodos	28
Resultados e Discussão	29
Conclusões	36

Referências	37
CAPÍTULO 4 – Esporulação de <i>Macrophomina phaseolina</i> em dois meios de cultura e discos foliares de diferentes hospedeiros	39
Resumo	39
Palavras-chave	39
Abstract	40
Keywords	40
Introdução	41
Material e Métodos	43
Resultados e Discussão	44
Conclusões	47
Referências	48

SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE GUANDU PARA RESISTÊNCIA A *Macrophomina phaseolina* E ESPORULAÇÃO DO FUNGO

RESUMO – Objetivou-se o ajuste de metodologia e seleção de genótipos de guandu para resistência a *Macrophomina phaseolina* a partir de material obtido pela Embrapa Pecuária Sudeste, e verificar o desenvolvimento micelial e esporulação do fungo em meios de cultura. O trabalho foi conduzido em casa de vegetação na UNESP/Jaboticabal no período de agosto de 2004 a dezembro de 2005. Para o ajuste de metodologia e seleção de genótipos resistentes ao fungo as sementes foram submetidas a escarificação com lixa d'água e inoculação artificial através do método de exposição das mesmas ao patógeno por diferentes períodos, que variaram de 0 a 72 horas. Foram avaliadas porcentagem de plantas sobreviventes e massa fresca. Já para o crescimento micelial e esporulação do fungo foi utilizado o método de sobreposição de discos de diferentes hospedeiros no meio de cultura. A escarificação das sementes contribuiu para a penetração do fungo nas mesmas o período de 24h de exposição das sementes ao fungo são suficientes para detectar diferenças no grau de resistência dos genótipos. Os genótipos mais resistentes são g167-97, g124-95, g27-94, g40-95, g154-95, g127-97 e g9m-97, e os mais suscetíveis são g48-95, g123-95, g8-95, g168-99 e g1m-95. A sobreposição de discos foliares de guandu em meio BDA e folha de papel de filtro em meio sojinha proporcionam um incremento na esporulação de *M. phaseolina*.

PALAVRAS-CHAVE: resistência, *Cajanus cajan* L. , *Macrophomina phaseolina*

SELECTION PIGEON PEA GENOTYPES RESISTANT TO *Macrophomina phaseolina* AND SPORULATION OF FUNGI

SUMMARY – This work had the objective of determining the best schedule for artificial inoculation and select pigeon pea genotypes resistant to *Macrophomina phaseolina* in material obtained by Embrapa Pecuária Sudeste, and verify the mycelial growth and sporulation of the fungi in middle of culture. The work were carried in greenhouse at the UNESP/Jaboticabal, from August 2004 to December 2005. For the methodology and selection adjustment of resistant genotypes to the fungi the seeds were submitted scarified with water sandpaper and artificial inoculation the seeds were the contact method to fungi for different periods, which varied from 0 to 72 hours. They were evaluated percentage of surviving plants and fresh mass. For the mycelial growth and sporulation of the fungi was used the superposition of disks method of different hosts in the middle of culture. The scarified of the seeds contributed for penetration of the fungi at the seeds; the period of 24h of contact of the seeds to the fungi enough to detect differences in the resistance degree of the genotypes. The genotypes g167-97, g124-95, g27-94, g40-95, g154-95, g127-97 and g9m-97 were found to be the most resistant and most susceptible were g48-95, g123-95, g8-95, g168-99 and g1m-95. The treatment with superposition of the leaf disks of pigeon pea in BDA and disks of filter paper in middle soybean extract were the treatments that provided better sporulation level in the conditions of that experiment were half.

KEYWORDS: resistant, *Cajanus cajan* L., *Macrophomina phaseolina*

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. A cultura do guandu

A espécie *Cajanus cajan* (L.) Millsp., forrageira conhecida como guandu, pertence à família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Cajaninae, com sinonímia de *Cajanus indicus* Spreng., *Cajanus flavus* D.C., *Cytipus cajanus* L. e *Cajanus cajan* (L.) Druce (CRONQUIST, 1981; WUTKE, 1987).

Apesar do centro de origem da espécie *Cajanus cajan* permanecer incerto, é provável que seja originária da Índia, onde é muito cultivada (Gooding, 1962, citado por WERNER, 1979), ou nativa da África, de onde teria se deslocado para a Índia e, posteriormente, introduzida na América Central e do Sul, na época do descobrimento do Novo Mundo, pelos europeus (WUTKE, 1987).

O guandu apresenta plantas perenes, eretas, arbustivas, com 1 a 3 m de altura, folhas trifolioladas, com pequenas glândulas na superfície (NENE et al., 1990). Ocupa mundialmente o sexto lugar em importância alimentar entre as leguminosas, sendo usada extensivamente na Ásia para a alimentação animal e humana. Para o produtor rural, o guandu proporciona baixos custos de produção que refletem diretamente no lucro da atividade pecuária e melhorias na fertilidade do solo, decorrentes da habilidade que essa forrageira apresenta para a fixação simbiótica de nitrogênio no solo (RAO, 2005).

Considerando que, dificilmente apenas uma cultura tenha capacidade para prover forragem durante o ano todo, a característica apresentada pelo guandu, de crescer em períodos adversos que limitam o crescimento de outras forrageiras,

constitui-se em importante alternativa para a provisão de alimento de alta qualidade e redução de custos com colheita e armazenamento de forragem no período da entressafra (RAO et al., 2002).

No Brasil, a cultura do guandu foi introduzida principalmente por sua resistência à seca e capacidade de crescer em solos pobres, apresentando bons resultados como fornecedora de massa verde nos pastos em períodos de chuvas escassas, além de ser planta muito versátil, adaptada às condições climáticas do país e utilizada também na rotação de culturas (ALVES & MEDEIROS, 1997).

A relativa baixa produtividade da cultura pode ser devida a diversos fatores, dentre eles a ocorrência de doenças. A Podridão Cinzenta do Caule, causada por *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid., está ocupando um lugar de destaque na cultura do guandu.

2. O patógeno *Macrophomina phaseolina*

Macrophomina phaseolina apresenta várias sinonímias como *M. phaseoli*, *M. cajani*, *M. sesami*, *Rhizoctonia bataticola* e *Sclerotium bataticola* entre outras (SARTORATO & RAVA, 1994). A explicação para essa grande variação de gêneros pode ser devido ao fato do fungo apresentar estádios picnidial e esclerodial bem definidos tendo sido o estádio picnidial relatado antes do esclerodial (DHINGRA & SINCLAIR, 1978). *M. phaseolina* está ordenada na Subdivisão Deuteromycotina, na Família Sphaeropsidaceae (MENEZES & OLIVEIRA, 1993) e é a única espécie que representa o gênero *Macrophomina*.

É um fungo que ataca mais de 500 espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas (WYLLIE & CALVERT, 1969), é habitante natural do solo, de grande variabilidade patogênica e alta capacidade de sobrevivência sob condições adversas. É favorecido por condições de alta temperatura e baixa umidade do solo, ou seja, clima quente e períodos de seca.

É um fungo polífago e cosmopolita que ataca inúmeras espécies de plantas cultivadas, entre elas: milho, soja, sorgo, amendoim, caupi, gergelim, feijão entre outras (MACHADO, 1980). De acordo com ANDRUS (1938) e SANTOS et al. (1984), para quase todas essas espécies, o fungo é eficientemente transmitido por sementes. Levando-se em conta que é um fungo que pode ser transmitido via semente, vale destacar que algumas espécies, quando transmitidas por essa via, quando isoladas e cultivadas em laboratório, perdem a capacidade de esporulação (SRINIVASAN et al., 1971).

Como o fungo *M. phaseolina* possui baixa capacidade de esporulação, alguns pesquisadores têm utilizado recursos alternativos visando minimizar o problema, utilizando extratos ou partes de plantas hospedeiras adicionados ao meio de cultura (CHIDAMBARAM & MATHUR, 1975; MACHADO, 1980; SRINIVASAN et al., 1971).

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

Para a esporulação, o substrato de crescimento, o fotoperíodo e a qualidade da luz são fatores importantes no processo reprodutivo de *M. phaseolina* (CHIDAMBARAM & MATHUR, 1975; MACHADO, 1980).

3. A Podridão Cinzenta do Caule

A Podridão Cinzenta do Caule ou Cancro da Haste foi descrita pela primeira vez na cultura do feijão, em 1905 por Maublanc. No Brasil foi registrada pela primeira vez em material colhido de feijão comum no município de Campinas – SP, por Bittencourt (COELHO NETO, 1994). Segundo ABAWI & PASTOR-CORRALES (1990) é uma doença de colo e raiz, comumente encontrada em muitos países da América e África, causando sérios prejuízos.

As condições favoráveis para o seu desenvolvimento são alta umidade e temperatura elevada (ZAMBOLIM & CHAVES, 1978). Porém, BIANCHINI et al. (2005)

afirmam que o fungo se desenvolve melhor na cultura do feijão em condições de temperatura de 27°C ou mais e estresse hídrico, o que também foi observado por BLANCO-LÓPEZ & JIMENES-DIAZ (1983) e DHINGRA & SINCLAIR (1978). Essa afirmação se contrasta com o observado por BAJPAL et al. (1999) que, trabalhando com 114 linhagens de guandu, na Índia, observaram que em condições de baixa temperatura e prolongada nebulosidade houve rápido desenvolvimento da doença “stem cancker” (Cancro da Haste) que tem como agente causal o fungo *M. phaseolina*.

Os sintomas da doença iniciam-se com lesões irregulares na haste da planta, ligeiramente deprimidas e escuras. As lesões adquirem coloração cinza e pode ocorrer clorose, murcha e morte de ramos ou de toda planta. Com o desenvolvimento das lesões, pode haver enfraquecimento do caule, resultando em quebra da planta. Em ataques severos, observa-se em lesões velhas a presença de numerosos pontos negros, formados por picnídios e escleródios do patógeno. O agente causal pode sobreviver no solo como escleródio ou em restos de cultura como picnídios (BIANCHINI et al., 2005).

4. Controle da Podridão Cinzenta do Caule

De acordo com KIMATI & BERGAMIN FILHO (1995) as medidas de controle podem ser direcionadas ao patógeno (evasão, exclusão e erradicação), ao hospedeiro (terapia, proteção e imunização) e ao ambiente (evasão e regulação). Os fungicidas também são muito utilizados (SOUZA & DUTRA, 2003) e o emprego de genótipos resistentes também é uma opção no controle do patógeno (LOPES & KIMATI, 1988a; LOPES & KIMATI, 1988b; MARINGONI & LAURETTI, 1999).

Segundo KIMATI & BERGAMIN FILHO (1995) a utilização de cultivares resistentes constitui uma das mais importantes medidas a serem incorporadas no manejo das doenças. É sempre a medida mais econômica, pois não acarreta aumento significativo nos custos de produção, além de ser compatível com outros métodos de controle.

De acordo com MALAVOLTA JÚNIOR et al. (1982), que estudaram o comportamento varietal de feijão, a variedade Chumbinho Opaco apresentou maior grau de resistência ao fungo.

PANIZZI (1988), avaliando a reação de cultivares de feijoeiro à *M. phaseolina* através de inoculação artificial, verificou que o comportamento das plantas variou desde o resistente ao altamente suscetível.

Segundo OLAYA & ABAWI (1996) a resistência do feijoeiro à *M. phaseolina* é determinada por dois genes complementares dominantes, indicando que a referida resistência tem uma base genética relativamente simples.

Em outras espécies também tem sido identificada variabilidade do patógeno. Dessa forma LOPES & KIMATI (1988a) e LOPES & KIMATI (1988b) avaliaram e identificaram fontes de resistência em girassol à *M. phaseolina* e observaram que o genótipo DK170 mostrou maior resistência.

RODRIGUES et al. (1997) estudaram genótipos de caupi e identificaram EPACE 10, L-198.002, L-288.004, L-190.004 e CNCx-377 como resistentes à podridão cinzenta do caule. PIO-RIBEIRO & ASSIS FILHO (1997) que também estudaram o comportamento de genótipos de caupi à *M. phaseolina*, observaram que o genótipo "Iron" foi o mais resistente.

ATHAYDE SOBRINHO (2004) estudando a detecção de *M. phaseolina* em amostras de sementes de caupi oriundas das regiões Norte e Nordeste do Brasil, observou que sementes com tegumento branco apresentaram maior incidência do fungo, quando comparadas com as de tegumento marrom e creme. Ainda esse mesmo autor estudando a reação de genótipos de caupi ao fungo observou que maior resistência genética foi manifestada pelas cultivares Mulato, Guariba e Maratauã e os genótipos Setentão e Tracuateua mostraram-se suscetíveis ao patógeno.

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

Trabalhos relacionados à existência de fontes de resistência em guandu a *M. phaseolina*, são escassos. A única referência encontrada na literatura consultada, foi o trabalho de BAJPAL et al. (1999).

Embora exista um número relativamente elevado de trabalhos com outras espécies, na literatura nacional existem poucos trabalhos com *M. phaseolina* em guandu. Sendo o guandu leguminosa perene de crescente importância para a pecuária e sendo a podridão da haste causada por *M. phaseolina* sua mais importante doença, é necessário que sejam estudadas possíveis formas de controle dessa doença nesta espécie. O objetivo deste trabalho foi a seleção de genótipos de guandu obtidos pela Embrapa Pecuária Sudeste, para resistência a *M. phaseolina*, por ser a medida de controle mais viável para esse patógeno.

REFERÊNCIAS

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

ALVES, S. J.; MEDEIROS, G. B. Leguminosas em renovação de pastagens. In: FAVORETTO, V.; RODRIGUES, L. R. A.; RODRIGUES, T. J. D. (Ed.). **Simpósio sobre ecossistemas de pastagens**. 3. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1997. p. 251-272

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

ATHAYDE SOBRINHO, C. **Patossistema Caupi x *Macrophomina phaseolina***: método de detecção em sementes, esporulação e controle do patógeno. 2004. 150 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

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**, Botucatu, v. 29, n. 1, p. 79, 2003.

BAJPAL, G. C.; SINGH, D. P.; TRIPATHI, H. S. Reaction of pigeon pea cultivars to a sudden appearance of *Macrophomina* stem canker disease at Pantnagar, India. **International Chickpea and Pigeon pea Newsletter**. India, n. 6, p. 41-42, 1999.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN

FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia**: doenças de plantas cultivadas, 4. ed. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 2005, v. 2, cap. 37, p. 333.

BLANCO-LOPÉZ, M. A.; JIMENES-DIAZ, M. A. Effect of irrigation on susceptibility of sunflower to *Macrophomina phaseoli*. **Plant Disease**, Saint-Paul, v. 67, n. 11, p. 1214-1216, 1983.

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

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

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia Press, 1981. 1262 p.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1978. 166 p.

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

LOPES, E. B. M.; KIMATI, H. Avaliação da reação de girassol (*Helianthus annuus*) a *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. no estágio adulto em condições de campo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 14, n. 1-4, p. 201-209, 1988b.

LOPES, E. B. M.; KIMATI, H. Efeito da concentração de inoculo de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. na reação de cinco genótipos de girassol (*Helianthus annuus*). **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.14, n. 1-4, p. 196-200, 1988a.

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

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**, Piracicaba, v. 8, n. 1-2, 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**, Brasília, v. 34, n. 4, p. 535-542, 1999.

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

NENE, Y. L.; HALL, S. D.; SHEILA, U. K. **The pigeon pea.** Cambridge: CAB, 1990. 490 p.

OLAYA, G.; ABAWI, G. S. Effect of water potential on mycelial growth and on production and germination of sclerotia of *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, Saint-Paul, v. 80, n. 12, p. 1347-1350, 1996.

PANIZZI, R.C. **Cultivares resistentes e tratamento químico de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.).** 1988. 151 f. Tese

(Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.

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**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1997. v. 2, p. 233-244.

RAO, S. C. **Pigeon pea May Fill Seasonal Forage Gap**. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/aug02/range0802.htm>>. Acesso em: 25 ago. 2005.

RAO, S. C.; COLEMAN, S. W.; MAYEUX, H. S. Forage production and nutritive value of selected pigeon pea ecotypes in the southern Great Plains. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 4, p. 1259-1263, 2002.

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 Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 170-172, 1997.

SANTOS, A. F.; ATHAYDE, J. T.; DAN, E. L. Microflora associada às sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) no Estado do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 9, n. 3, p. 379, 1984.

SARTORATO, A.; RAVA, C. A. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília. EMBRAPA – SPI, 1994. p. 143.

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

SRINIVASAN, M. C.; CHIDAMBARAM, 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.

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

WERNER, J. C. O potencial do guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) como planta forrageira. **Zootecnia**, Nova Odessa, v. 17, n. 2, p. 73-100, 1979.

WUTKE, E. B. **Caracterização fenológica e avaliação agrônômica de genótipos de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.)**. 1987. 164 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1987.

WYLLIE, T.D., CALVERT, O.H. Effect of flower and pod set on formation of sclerotia and infection of *Glycine max* by *Macrophomina phaseoli*. **Phytopathology**, Saint-Paul, v. 59, p. 1243-1245, 1969.

ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G. M. Doenças do feijoeiro e seu controle. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 4, n. 46, p. 50-63, 1978.

CAPÍTULO 2 – AJUSTE DE METODOLOGIA PARA AVALIAR RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE GUANDU A *Macrophomina phaseolina*

RESUMO – Com o objetivo de ajustar a metodologia para avaliar resistência de guandu a *Macrophomina phaseolina*, foram realizados 3 ensaios desenvolvidos no período de agosto de 2004 a fevereiro de 2005 no Laboratório de Fitopatologia e em casa de vegetação do Departamento de Fitossanidade da FCAV – UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Os tratamentos utilizados foram: inoculação das sementes cujo período variou de 0 a 72 horas de exposição das sementes com o fungo; semeadura das sementes de guandu, ao lado de sementes de sorgo colonizadas com o fungo e imersão das sementes de guandu em suspensão de micélio do fungo por 3 minutos antes de serem semeadas. As sementes antes da inoculação e do plantio foram previamente escarificadas com lixa d'água para que houvesse quebra de dormência das mesmas. Para a inoculação das sementes dos diferentes genótipos de guandu essas foram colocadas em placas de Petri, sobre meio de cultura BDA (batata-dextrose-água) contendo crescimento micelial do fungo. Após o período de incubação as sementes de todos os tratamentos foram colocadas em vasos com capacidade de 5 litros, contendo solo esterilizado numa proporção de 3:1:1 (solo:esterco:areia), cobertas com uma camada de cerca de 3 cm dessa mesma mistura e mantidos em casa de vegetação. O isolado utilizado para esses ensaios foi o de feijão. Essa metodologia foi igual para todos os ensaios. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com 4 repetições de 5 sementes por vaso. O método de imersão das sementes de guandu em suspensão de micélio não foi eficiente na inoculação das sementes. A escarificação das sementes foi importante para a germinação e também contribuiu para a penetração do fungo nas mesmas. O período de 24 horas de contato das sementes com o fungo foi suficiente para a inoculação das

sementes, pois o fungo conseguiu causar a morte de plântulas possibilitando selecionar genótipos resistentes ao fungo.

PALAVRAS-CHAVE: guandu, inoculação, *Macrophomina phaseolina*

**ABSTRACT – METHODOLOGY ADJUST FOR ARTIFICIAL INOCULATION OF
PIGEON PEA SEEDS WITH *Macrophomina phaseolina***

This work had the objective of determining the best schedule for artificial inoculation of pigeon pea seeds with *Macrophomina phaseolina*. There were accomplished a total of three trials, from August 2004 to February of 2005 in the Phytopathology Laboratory of and greenhouse of the Department of Phytopathology of FCAV - UNESP, Jaboticabal Campus. The treatments to which the seeds were submitted varied from 0 to 72 hours of contact of the seeds with the fungus. Other used treatments were: planting of sorghum seeds inoculated together with the mushroom with the pigeon pea seeds and immersion of the seeds in solution of micelia of the fungus for three minutes before they were planted. The seeds were scarified with water sandpaper to break dormancy. For the inoculation the seeds of the different pigeon pea genotypes were placed on BDA (potato-dextrose-agar) in Petri dishes containing micelia of the fungus. After the incubation period the seeds were planted in five liter pots, containing sterilized soil in a proportion of 3:1:1 (soil:manure:sand),. That the same process was performed for all trials. The experiment was carried out in a completely randomized design in factorial project, with 4 repetitions and 5 seeds per pot. The method of immersion of the seeds pigeon pea in micelia suspension was not efficient for the inoculation of the seeds. The scarification of the seeds was important for the germination of the seeds and it also contributed to the penetration of the mushroom in the same ones. Schedules above 24 hours of contact of the seeds with the fungus are unnecessary for the inoculation of the seeds, because with 24 hours of contact the fungus penetrate the seed.

KEYWORDS: pigeon pea, inoculation, *Macrophomina phaseolina*

INTRODUÇÃO

No Brasil, a cultura do guandu (*Cajanus cajan* L.) foi introduzida devido sua resistência à seca e adaptação a solos pobres, além de ser uma planta bem adaptada às condições climáticas do país, apresentando bons resultados como fornecedora de grãos para alimentação humana e massa verde nos pastos em períodos de chuvas escassas (ALVES & MEDEIROS, 1997).

Como em várias outras culturas, no guandu também ocorrem algumas doenças de grande importância, como por exemplo, a Podridão Cinzenta do Caule, que tem como agente causal o fungo *Macrophomina phaseolina* Tass. (Goid.).

Maublanc foi o primeiro pesquisador a descrever essa doença em 1905, ocorrendo em feijão. A partir daí tem sido relatada em quase todo o mundo (ZAMBOLIM & CHAVES, 1978).

Macrophomina phaseolina é um fungo que ataca mais de 500 espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas (WYLLIE & CALVERT, 1969). É habitante natural do solo, de grande variabilidade patogênica e alta capacidade de sobrevivência sob condições adversas. É favorecido por condições de alta temperatura e baixa umidade do solo, ou seja, clima quente e períodos de seca. Para a maioria das espécies o fungo é transmitido pela semente, com muita eficiência (ANDRUS, 1938; DINGHRA & SINCLAIR, 1978). No entanto, vale ressaltar que diversas espécies de fungos transmitidos por sementes, perdem sua capacidade de esporulação, quando isoladas e cultivadas artificialmente (SRINIVASAN et al., 1971).

SACKSTON (1969) trabalhando com caupi, isolou *Sclerotium bataticola*, sinônimo de *M. phaseolina*, mesmo após desinfestação das sementes. Esse fato comprova que o fungo pode ser transportado internamente via semente.

BOLKAN et al. (1978) detectaram 25 gêneros de fungos em diversas variedades de feijão comum e feijão caupi, dentre esses gêneros está *M. phaseolina* que foi classificada como um dos microrganismos mais freqüentes no experimento.

Com base nessas informações o objetivo desse trabalho foi detectar qual melhor método para seleção de genótipos de guandu resistentes a *M. phaseolina*.

MATERIAL E MÉTODOS

Visando o ajuste de metodologia para seleção de genótipos de guandu resistentes a *Macrophomina phaseolina* foram realizados 3 ensaios no período de agosto de 2004 a fevereiro de 2005, no Laboratório de Fitopatologia e em casa de vegetação do Departamento de Fitossanidade da FCAV – UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Para se realizar os primeiros ensaios foram utilizados os genótipos de guandu g10-94 e g121-99, escolhidos aleatoriamente, pois não se tinha informação sobre a resistência desses a *M. phaseolina*.

No Ensaio 1 foi utilizado o genótipo g10-94, e os tratamentos foram: sementes escarificadas e não escarificadas submetidas aos períodos de 0, 8, 32, 48 horas de exposição ao fungo; sementes plantadas em solo com sementes de sorgo colonizadas pelo fungo e imersão das sementes de guandu em suspensão micelial do fungo por 3 minutos. No Ensaio 2 foram utilizados os genótipos g10-94 e g121-99 e os tratamentos constaram de: sementes escarificadas e não escarificadas submetidas aos períodos de 0, 48, 60 e 72 horas de exposição ao fungo, e sementes semeadas em solo com sementes de sorgo colonizadas com o fungo. A escarificação das sementes foi feita com o auxílio de lixa d'água através de abrasão por 30 segundos, com objetivo de quebrar a dormência das mesmas. Para a inoculação, as sementes dos diferentes genótipos de guandu foram colocadas em placas de Petri, sobre meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), contendo colônias do fungo. No Ensaio 3 as sementes também

foram submetidas a não escarificação e escarificação com lixa d'água. Os períodos de inoculação das sementes utilizados nesse ensaio foram: 0, 24 e 40 horas de exposição ao fungo. A inoculação das sementes para esse ensaio foi realizada da mesma forma que para os ensaios anteriores. Para a realização desse ensaio foram utilizados os mesmos genótipos do Ensaio 2. Após o período de incubação, as sementes foram colocadas em vasos com capacidade de 5 litros, contendo solo esterilizado numa proporção de 3:1:1 (solo:esterco:areia), cobertas com uma camada de cerca de 3 cm dessa mesma mistura e mantidos em casa de vegetação. A metodologia foi igual para todos os ensaios.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com 4 repetições e 5 sementes por vaso.

Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, de acordo com o relatado por BANZATO & KRONKA (1995), com utilização do programa ESTAT desenvolvido pelo Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP – Câmpus de Jaboticabal.

Os métodos de inoculação foram avaliados através da porcentagem de plantas vivas e os dados transformados em arco seno $(P/100)^{1/2}$, onde P é a porcentagem de plantas vivas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio 1: Observando-se os dados da Tabela 1 verifica-se que os tratamentos de 32 e 48 horas de exposição das sementes ao fungo e contato das sementes de guandu com semente de sorgo colonizadas com o fungo no plantio foram os que se mostraram mais eficientes como método de inoculação para sementes escarificadas. Já esses mesmos tratamentos não foram eficientes para sementes não escarificadas. Isso demonstra que a escarificação das sementes facilita a penetração do fungo, que pode levar à morte das plantas. O método de imersão das sementes em suspensão de

micélio não foi eficiente para seleção de genótipos de guandu resistentes a *M. phaseolina*.

Tabela 1 – Reação do genótipo de guandu g10-94 a *Macrophomina phaseolina*, avaliada pela sobrevivência de plantas em diferentes métodos de inoculação.

Métodos de inoculação	Porcentagem de plantas sobreviventes	
	Sementes escarificadas	Sementes não escarificadas
0 horas	90 aA	80 aA
8 horas	95 aA	85 aA
32 horas	80 aAB	100 aA
48 horas	45 bC	85 aA
Sementes de sorgo parasitadas	55 bBC	85 aA
Suspensão de micélio	90 aA	80 aA
CV %	18,3	

Letras iguais, minúscula na coluna e maiúsculas na linha, indicam que as médias não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Ensaio 2: Analisando os resultados apresentados na Tabela 2, observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos de sementes escarificadas e não escarificadas para a testemunha, onde as sementes escarificadas tiveram maior porcentagem de plantas sobreviventes em relação às sementes não escarificadas. As sementes não germinadas que resultaram em menor número de plantas sobreviventes, provavelmente mantiveram-se dormentes sob o solo. O oposto foi observado para os tratamentos com 48 e 60 horas de inoculação das sementes. Sementes que sofreram escarificação tiveram sua germinação reduzida em relação às sementes não escarificadas, pois a escarificação favoreceu a penetração do fungo e conseqüente

morte das mesmas. Já para os tratamentos de 72 horas de inoculação e semente de sorgo parasitadas, não houve diferença significativa. O tratamento com sementes de sorgo colonizadas não foi significativo a ponto de ser considerado um bom método de inoculação artificial das sementes, tanto para as escarificadas como para as não escarificadas.

Tabela 2 – Efeito da escarificação e do período de exposição das sementes de guandu (genótipos g10-94 e g121-99) a *Macrophomina phaseolina* na porcentagem de plantas sobreviventes. (Interação Exposição da semente x Tratamento).

Tratamento	Exposição da semente				
	0 horas	48 horas	60 horas	72 horas	Sorgo
semente escarificada	77,14 aA	4,29 bC	1,43 bC	12,86 aC	39,29 aB
semente intacta	59,57 bA	18,57 aB	17,22 aB	15,86 aB	33,43 aB
CV %	53,3				

Letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas na linha, indicam que as médias não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Portanto acredita-se que os tratamentos sementes escarificadas e inoculadas, com exposição pelo período de 48 e 60 horas, foram mais eficientes para proporcionar a ação do fungo do que para germinação. Já o tratamento semente escarificada e inoculada com 72 horas de exposição ao fungo foi muito drástico, ou seja, as sementes ficaram muito tempo em contato com o patógeno o que causou sua morte.

Na Tabela 3 pode-se observar que a escarificação das sementes para o genótipo g10-94 proporcionou aumento na germinação pela quebra da dormência das sementes.

Tabela 3 – Efeito da escarificação das sementes inoculadas com *Macrophomina phaseolina* e dos genótipos de guandu na porcentagem de plantas sobreviventes. (Interação Tratamento x Genótipo).

Tratamento	Genótipo	
	g 10-94	g 121-99
Sementes escarificadas	24,69 aA	29,32 aB
Semente não escarificadas	15,86 bB	42,00 aA
CV %	53,3	

Letras iguais, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, indicam que as médias não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Ensaio 3: Analisando os resultados obtidos na Tabela 4 observa-se que a escarificação das sementes favoreceu a penetração do fungo, assim como no ensaio anterior.

Observa-se também que não houve diferença significativa quanto ao tempo de exposição de 24 e 48 horas das sementes escarificadas com o fungo, embora a porcentagem de plantas sobreviventes tenha sido baixa, sendo 4,29 e 1,43, respectivamente.

Tabela 4 – Efeito da escarificação e do período de exposição das sementes de guandu (genótipos g10-94 e g121-99) a *Macrophomina phaseolina* na porcentagem de plantas sobreviventes. (Interação Exposição da semente x Tratamento).

Tratamento	Exposição da semente		
	0 horas	24 horas	40 horas
Sementes escarificadas	88,57 aA	4,29 bB	1,43 bB
Sementes não escarificadas	78,50 aA	34,93 aB	21,72 aC

Letras iguais, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, indicam que as médias não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Na Tabela 5 observa-se que, comparando os genótipos avaliados dentro dos períodos de inoculação do fungo, o genótipo g121-99 foi mais suscetível ao fungo em ambos os tratamentos (24 e 40 horas de exposição ao fungo). Observa-se ainda que houve diferença significativa entre os tratamentos em relação à testemunha (0 horas).

Tabela 5 – Efeito dos genótipos e do período de exposição das sementes de guandu a *Macrophomina phaseolina* na porcentagem de plantas sobreviventes. (Interação entre Genótipo x Exposição da semente).

Genótipo	Exposição da semente		
	0 horas	24 horas	40 horas
g 10-94	82,85 aA	30,57 aB	21,72 aB
g 121-99	84,21 aA	8,65 bB	1,43 bB

Letras iguais, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, indicam que as médias não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A Tabela 6 mostra os resultados da interação entre sementes escarificadas, não escarificadas e genótipos. Verifica-se que para o genótipo g10-94 a escarificação das sementes resultou em menor número de plantas sobreviventes, devido as sementes tornarem-se mais expostas ao fungo. Tal resultado demonstra também que genótipo g10-94 apresentou maior suscetibilidade a *M. phaseolina*. Já para o genótipo g121-99 os tratamentos sementes escarificadas ou não, não diferiram entre si, embora esse genótipo pareça ser mais suscetível ao fungo.

Tabela 6 – Efeito dos genótipos e da escarificação das sementes de guandu inoculadas com *Macrophomina phaseolina* na porcentagem de plantas sobreviventes. (Interação entre Genótipo x Tratamento).

Genótipo	Tratamento	
	Sementes escarificadas	Sementes não escarificadas
g 10-94	30,48 aB	59,62 aA
g 121-99	32,38 aA	30,48 bA

Letras iguais, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, indicam que as médias não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

CONCLUSÕES

- A escarificação das sementes de guandu favorece a inoculação de *Macrophomina phaseolina* para avaliação de resistência.

- A utilização de imersão das sementes de guandu em suspensão de micélio não é um bom método de inoculação com *Macrophomina phaseolina* para avaliação de resistência.

- Períodos de 24 horas de exposição das sementes de guandu escarificadas são suficientes para detectar diferenças na resistência para *Macrophomina phaseolina*.

REFERÊNCIAS

ALVES, S. J.; MEDEIROS, G. B. Leguminosas em renovação de pastagens. In: FAVORETTO, V.; RODRIGUES, L.R.A.; RODRIGUES, T.J.D. (Ed.). **Simpósio sobre ecossistemas de pastagens**. 3. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1997. p. 251-272

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

BANZATO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 3. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1995, 247 p.

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**, Brasília, v. 3, n. 1, p. 77-78, 1978.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1978. 166 p.

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

SRINIVASAN, M. C.; CHIDAMBARAM, 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.

WYLLIE, T. D., CALVERT, O. H. Effect of flower and pod set on formation of sclerotia and infection of *Glycine max* by *Macrophomina phaseoli*. **Phytopathology**, Saint-Paul, v. 59, p. 1243-1245, 1969.

ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G. M. Doenças do feijoeiro e seu controle. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 4, n. 46, p. 50-63, 1978.

CAPÍTULO 3 – SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE GUANDU PARA RESISTÊNCIA A *Macrophomina phaseolina*

RESUMO - Visando selecionar genótipos de guandu resistentes a *Macrophomina phaseolina* foram instalados 4 ensaios no período de abril a dezembro de 2005 no Departamento de Fitossanidade da UNESP – Jaboticabal (SP). Para inoculação, as sementes foram previamente desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 3 minutos, germinadas e posteriormente colocadas em exposição ao fungo desenvolvido em BDA, contido em placas de Petri. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial. Os tratamentos utilizados em cada ensaio foram: ensaio 1 – período de exposição das sementes ao fungo (0, 16, 24 horas) e 20 genótipos; ensaio 2 – período de exposição das sementes ao fungo (0, 24, 32 horas) e 19 genótipos; ensaio 3 – período de exposição das sementes ao fungo (0, 24, 32 horas) e 17 genótipos; ensaio 4 – período de exposição das sementes ao fungo (0 e 32 horas) e 31 genótipos. Os genótipos mais resistentes a *M. phaseolina* foram g167-97, g124-95, g27-94, g40-95, g154-95 e os mais suscetíveis g48-95, g123-95, g8-95 e g168-99. Comparando os tratamentos observou-se que o período de 32h de exposição das sementes ao fungo foi o melhor para detectar diferentes graus de resistência nos genótipos de guandu testados.

PALAVRAS-CHAVE: *Cajanus cajan* L., fungo, resistência

**ABSTRACT - SELECTING PIGEON PEA GENOTYPES RESISTANT TO
*Macrophomina phaseolina***

To select pigeon pea genotypes resistant to *Macrophomina phaseolina*, four experiments were carried out from April through December 2005 at the Department of Phytopathology UNESP, Jaboticabal, Brazil. Before inoculation, the seeds were disinfested in an 1% sodium hypochlorite solution for 3 minutes, germinated and then put in contact with the fungus which had been previously developed in BDA in Petri dishes. The experiments were set according to a completely random design in a factorial arrangement. In each experiment the treatments were: 1. 20 genotypes and periods of contact between the seeds and the fungus of 0, 16, and 24 hours. 2. 19 genotypes and periods of contact between the seeds and the fungus of 0, 24, and 32 hours. 3. 17 genotypes and periods of contact between the seeds and the fungus of 0, 24, and 32 hours, and 4. 31 genotypes and periods of contact between the seeds and the fungus of 0 and 32 hours. The lines g167-97, g124-95, g27-94, g40-95, and g154-95 were found to be the most resistant genotypes whereas g48-95, g123-95, g8-95, and g168-99 were the less resistant ones. The 32 hour period of contact between seeds and the fungus was found to be the most effective to find out the degree of pigeon pea genotypes resistance to *Macrophomina phaseolina*.

KEYWORDS: *Cajanus cajan* L., fungus, resistant

INTRODUÇÃO

No Brasil, a cultura do guandu (*Cajanus cajan* L.) foi introduzida, principalmente devido a sua resistência à seca e adaptação a solos pobres, além de ser uma planta bem adaptada às condições climáticas do país, apresentando bons resultados como fornecedora de grãos para alimentação humana e massa verde nos pastos em períodos de chuvas escassas (ALVES & MEDEIROS, 1997).

Como várias outras culturas, o guandu também apresenta algumas doenças de grande importância, como por exemplo, a Podridão Cinzenta da Haste ou Cancro da Haste, que tem como agente causal o fungo *Macrophomina phaseolina* Tass. (Goid.). Maublanc foi o primeiro a descrever essa doença, em 1905, ocorrendo em feijão. A partir daí tem sido relatada em quase todo o mundo (ZAMBOLIM & CHAVES, 1978).

Macrophomina phaseolina é um fungo que ataca mais de 500 espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas (WYLLIE & CALVERT, 1969), é habitante natural do solo, de grande variabilidade patogênica e alta capacidade de sobrevivência sob condições adversas. É favorecido por condições de alta temperatura e baixa umidade do solo, ou seja, clima quente e períodos de seca.

Na literatura nacional existem poucos trabalhos com *M. phaseolina* em guandu, porém há inúmeros estudos deste patógeno em outras culturas, como feijoeiro, onde há relatos de redução de área de plantio no Nordeste da Bahia, devido à ocorrência da doença. Dada à importância do assunto, o presente trabalho teve por objetivo selecionar genótipos de guandu resistentes à *M. phaseolina*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios para seleção de genótipos de guandu visando resistência a *M. phaseolina* foram realizados no período de abril a novembro de 2005 no Laboratório de Fitopatologia e em casa de vegetação do Departamento de Fitossanidade da FCAV – UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Foram testados 37 genótipos desenvolvidos pela Embrapa Pecuária Sudeste, em 4 ensaios, designados Ensaios 1, 2, 3 e 4.

Para inoculação, as sementes dos diferentes genótipos de guandu foram colocadas em placas de Petri, sobre meio de cultura contendo colônias do fungo. Após o período de incubação as sementes pré-germinadas foram semeadas em vasos com capacidade de 5 litros, contendo solo esterilizado numa proporção de 3:1:1 (solo:esterco:areia), cobertas com uma camada de cerca de 3 cm desta mesma mistura e mantidos em casa de vegetação.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com 4 repetições e 5 sementes por vaso. Os tratamentos os quais as sementes foram submetidas, em todos os ensaios, variaram de: 0, 16, 24 e 32 horas de exposição ao fungo em meio BDA (batata-dextrose-ágar). Em todos os ensaios as sementes foram previamente submetidas a uma desinfestação superficial em solução de hipoclorito de sódio 1%, durante 3 minutos, e colocadas para pré-germinar.

O critério de avaliação constituiu na determinação do número de plantas sobreviventes, após 40 dias do plantio. Além disso, também foi avaliada a massa fresca das plantas correspondentes aos Ensaios 2, 3 e 4. Para isso as plantas foram colhidas e imediatamente pesadas.

Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) segundo BANZATO & KRONKA (1995), com utilização do programa ESTAT desenvolvido pelo Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Os dados de porcentagem de plantas vivas foram transformados em arco seno $(P/100)^{1/2}$, onde P é a porcentagem de plantas vivas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio 1: Analisando-se os dados da Tabela 1 observa-se que o genótipo g1m-95 foi o que se mostrou mais suscetível a *M. phaseolina*, apresentando a menor porcentagem de plantas sobreviventes após 16 h e 24 h de exposição das sementes ao fungo. Por outro lado, esse mesmo genótipo não diferiu estatisticamente de g168-99, g58-95, g19m-95, g29m-94 e g137-99 para o tratamento de 16 horas de exposição das sementes ao fungo, que por sua vez também não diferiram dos demais genótipos testados com relação à resistência, exceto o genótipo g168-99. Para o tratamento de 24 horas de exposição das sementes ao fungo o genótipo g1m-95 se mostrou mais suscetível ao fungo, juntamente com o genótipo g18-95. Os genótipos mostraram-se resistentes ao fungo foram g167-97 e g124-95 no tratamento de 24 horas de exposição das sementes ao fungo, apesar de não terem diferido estatisticamente da maioria dos genótipos, exceto os genótipos g108-99, g168-99, g47-94, g295-94, g29m-94, g137-99, g18-95 e g1m-95.

A reação dos genótipos que apresentaram maior suscetibilidade ao fungo foi bastante visível nos primeiros dias de condução do ensaio, pois houve “damping-off” logo na primeira semana, em decorrência do ataque do fungo.

Durante o período de condução do ensaio (40 dias) não foi observado, nas plantas sobreviventes, o aparecimento de sintomas característicos de Podridão Cinzenta do Caule. O mesmo não aconteceu com BAJPAL et al. (1999) que, trabalhando com 114 linhagens de guandu, na Índia, observaram que em condições de baixa temperatura e prolongada nebulosidade houve rápido desenvolvimento da doença “stem cancker” (Cancro da Haste). Essa afirmação se contrasta com as descritas no Brasil, onde alguns autores afirmam que para o desenvolvimento da doença em feijoeiro, as condições favoráveis são de alta umidade e temperatura elevada (ZAMBOLIM & CHAVES, 1978). Porém, BIANCHINI et al. (2005) afirmam que o fungo se desenvolve melhor na cultura do feijoeiro em condições de temperatura de 27°C ou mais e estresse hídrico, o que também foi observado por BLANCO-LÓPEZ & JIMENES-DIAZ (1983) e DHINGRA & SINCLAIR (1978).

Tabela 1 – Resistência de genótipos de guandu a *Macrophomina phaseolina*, avaliada pelo método de inoculação do fungo nas sementes – 2005.

Genótipo	Porcentagem de plantas sobreviventes*		
	0 h	16 h	24 h
g127-97	100 aA	100 aA	95 abA
g167-97	100 aA	100 aA	100 aA
g108-99	100 aA	100 aA	75 bcdB
g119-99	95 aA	95 aA	95 abA
g186-99	100 aA	95 aA	75 bcdB
g124-95	100 aA	100 aA	100 aA
g168-99	90 aA	65 bcB	70 bcdAB
g10-94	100 aA	100 aA	95 abA
g58-95	100 aA	90 abcA	85 abcA
g154-95	100 aA	100 aA	85 abcdB
g47-94	100 aA	100 aA	75 bcdB
g6-95	100 aA	95 aA	95 abA
g19m-95	100 aA	90 abcAB	85 abcdB
g295-94	100 aA	100 aA	50 deB
g29m-94	95 aA	90 abcA	65 cdB
g137-99	95 aA	95 abcA	60 cdB
g142-95	100 aA	100 aA	95 abA
g18-95	95 aA	95 aA	20 efB
g66-95	100 aA	90 abAB	85 abcdB
g1m-95	85 aA	60 cB	15 fC
CV %		13,95	

Médias na coluna e na linha seguidas de mesmas letras minúsculas e maiúsculas, respectivamente, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Período de condução do ensaio 1: 26/04/2005 - 20/05/2005. Dados originais.

Nesse ensaio observou-se que a maioria dos genótipos de guandu apresentou comportamento entre resistente e medianamente resistente para o isolado de *M. phaseolina* testado.

Dados obtidos por ATHAYDE SOBRINHO (2004), que trabalhou com 12 genótipos de caupi, mostraram que há uma ampla variação quanto à reação dos genótipos para *M. phaseolina*. O mesmo aconteceu com os genótipos de guandu avaliados nesse ensaio.

Com relação ao período de inoculação das sementes, o de 24 horas permitiu detectar melhor a suscetibilidade dos genótipos a *M. phaseolina*.

Ensaio 2: Na Tabela 2 observa-se que para a porcentagem de plantas sobreviventes no tratamento de 24 horas de exposição das sementes com o fungo, os genótipos que apresentaram maior resistência foram g127-97, g108-99, g124-95 e g154-95, que por sua vez não diferiram estatisticamente dos demais genótipos, exceto g119-99, g186-99 e g168-99, que se mostraram mais suscetíveis ao patógeno. Para o tratamento de 32 horas de exposição das sementes ao fungo, assim como para o de 24 horas, a maioria dos genótipos apresentou alto grau de resistência. Os genótipos que apresentaram maior grau de suscetibilidade foram g119-99, g186-99, g168-99, g10-94, g154-95 e g66-95. Para os genótipos g10-94 e g154-95 no final da avaliação não havia nenhuma planta viva. O genótipo g124-95 se mostrou com o mesmo grau de resistência para todos os tratamentos tanto nesse ensaio assim como no anterior.

Houve genótipos que apresentaram comportamentos distintos para o mesmo tratamento quando comparados nos dois ensaios, como é o caso dos genótipos g108-99, g47-94, g295-94, g29m-94, g137-99 e g18-95. Isso se deve ao fato de que, provavelmente, a resistência desses genótipos ao fungo é do tipo resistência horizontal.

O tratamento de 32 horas de exposição das sementes ao fungo permitiu separar melhor os genótipos que apresentaram diferentes graus de resistência.

O comportamento dos genótipos de guandu com relação à resistência a *M. phaseolina* foi o mesmo tanto quando avaliado pela porcentagem de plantas

sobreviventes como pela massa fresca das plantas, porém a facilidade para avaliar a resistência pela porcentagem de plantas vivas é muito maior e mais rápida.

Tabela 2 – Resistência de genótipos de guandu a *Macrophomina phaseolina*, avaliada pelo método de inoculação do fungo nas sementes – 2005.

Genótipo	Porcentagem de plantas sobreviventes*			Massa fresca (g/planta)		
	0 h	24 h	32 h	0 h	24 h	32 h
g127-97	100 aA	100 aA	100 aA	3,80 A	3,00 A	2,89 A
g167-97	100 aA	95 abA	90 abcA	3,24 A	2,43 A	2,41 A
g108-99	100 aA	100 aA	95 abA	4,59 A	3,61 A	2,92 A
g119-99	100 aA	50 bcB	30 defB	4,21 A	2,62 A	1,55 A
g186-99	95 aA	50 bcB	50 bcdeB	3,20 A	3,19 A	2,84 A
g124-95	100 aA	100 aA	100 aA	4,92 A	3,43 B	3,18 B
g168-99	75 aA	45 cAB	20 efB	3,85 A	2,84 A	2,36 A
g10-94	85 aA	60 bcA	0 fC	4,68 A	3,61 A	0,00 B
g58-95	100 aA	95 abA	95 abA	4,01 A	3,41 A	3,34 A
g154-95	100 aA	100 aA	0 fB	3,52 A	2,06 B	0,00 C
g47-94	100 aA	85 abcA	90 abcA	4,10 A	5,14 A	4,36 A
g6-95	100 aA	90 abcA	90 abcA	3,60 A	3,47 A	3,26 A
g19m-95	95 aA	90 abcA	90 abcA	4,01 A	3,90 A	3,66 A
g295-94	95 aA	95 abA	85 abcA	4,36 A	4,06 A	3,77 A
g29m-94	100 aA	90 abcAB	75 abcdB	5,07 A	3,56 B	3,53 B
g137-99	95 aA	80 abcA	80 abcA	2,65 A	4,24 A	4,10 A
g142-95	100 aA	75 abcB	60 abcdeB	4,21 A	3,25 A	1,91 B
g18-95	100 aA	90 abcA	55 abcdeB	3,55 A	2,84 A	2,94 A
g66-95	85 aA	80 abcAB	45 cdeB	3,95 A	4,13 A	3,97 A
CV %	21,10					

Médias na coluna e na linha seguidas de mesmas letras minúscula e maiúscula, respectivamente, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Período de condução do ensaio 2: 11/05/2005 - 19/06/2005.

* Dados originais.

Tabela 3 – Resistência de genótipos de guandu a *Macrophomina phaseolina*, avaliada pelo método de inoculação do fungo nas sementes – 2005.

Genótipo	Porcentagem de plantas sobreviventes*			Massa fresca (g/planta)		
	0 h	24 h	32 h	0 h	24 h	32 h
g27-94	100 aA	100 aA	80 abcA	1,76 B	1,98 AB	2,43 A
g3-94	100 aA	95 abA	80 abcA	2,14 A	2,11 A	2,67 A
g8-95	95 abA	75 abcdA	35 cdeB	3,08 A	2,63 A	2,61 A
g9m-97	85 abcA	80 abcdA	100 aA	1,93 A	2,38 A	1,49 A
g146-97	75 abcAB	85 abcdA	50 bcdeB	1,60 A	1,62 A	1,62 A
g40-95	65 abcdA	95 abA	75 abcdA	2,07 A	1,96 A	1,80 A
g184-97	55 abcdeA	30 deAB	0 eB	1,41 AB	1,88 A	0,00 C
g121-99	95 abA	75 abcdeA	90 abcA	2,65 A	3,07 A	3,00 A
g149-99	50 abcdeA	80 abcdA	85 abcA	1,10 A	1,09 A	0,93 A
g123-99	10 eA	35 deA	45 bcdeA	1,04 A	1,11 A	1,38 A
g109-99	35 cdeA	35 cdeA	25 deA	0,61 A	0,43 A	0,06 A
g59-95	50 abcdeA	45 bcdeA	85 abcA	0,97 A	0,76 A	0,96 A
g48-95	15 deA	20 eA	10 eA	0,83 A	0,66 A	1,13 A
g138-99	95 abA	90 abcA	95 abA	1,39 A	1,43 A	1,57 A
g154-95	45 bcdeA	55 abcdeA	75 abcdA	4,46 A	4,60 A	0,49 B
g124-95	80 abcA	85 abcdA	95 abA	1,42 A	1,22 A	1,92 A
g119-99	90 abcA	95 abA	85 abcA	2,34 A	2,40 A	2,31 A
CV %		30,32				

Médias na coluna e na linha seguidas de mesmas letras minúscula e maiúscula, respectivamente, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Período de condução do ensaio 3: 06/06/2005 - 16/07/2005. * Dados originais.

Ensaio 3: Na Tabela 3 observa-se que para porcentagem de plantas sobreviventes houve diferença significativa para os genótipos nas testemunhas. Isso se deve ao fato de que as sementes apresentavam-se com baixa germinação, devido à presença de outros fungos associados a elas, os quais causaram apodrecimento durante a pré-germinação. A desinfestação superficial feita com solução de hipoclorito de sódio 1% não foi suficiente para eliminar esses fungos. Para o tratamento de 24 horas de exposição das sementes ao fungo o genótipo g27-94 foi o que apresentou

maior resistência ao fungo, apesar de não ter diferido estatisticamente da maioria dos genótipos, exceto de g184-97, g123-99, g109-99, g59-95 e g48-95, sendo esse último o que apresentou maior grau de suscetibilidade.

Já o genótipo mais resistente para o tratamento de 32 horas foi o g9m-97, que estatisticamente não diferiu de g27-94, g3-94, g40-95, g121-99, g149-99, g59-95, g138-99, g154-95, g124-95 e g119-99.

Os genótipos g184-97 e g154-95 sofreram redução significativa na quantidade de massa fresca das plantas para o período de 32 horas de inoculação das sementes.

Ensaio 4: Na Tabela 4 observa-se que o tratamento de 32 horas de exposição das sementes ao fungo, não reduziu o número de plantas sobreviventes para os genótipos g40-95, g154-95 e g295-94, que não diferiram estatisticamente da maioria, com exceção dos genótipos g8-95, g146-97, g59-95, g48-95, g138-99, g1m-95, g168-99, g10-94 e g18-95, que apresentaram alto grau de suscetibilidade para a característica porcentagem de plantas sobreviventes. Os genótipos g154-95 e g119-99 se comportaram diferentemente nos ensaios, isso deve ter ocorrido pela alta influência do ambiente, pois é sabido que o desenvolvimento do fungo é influenciado pela temperatura, e o ensaio 4 foi conduzido numa época mais quente que os demais ensaios.

Em relação aos resultados de massa fresca das plantas o genótipo que apresentou diferença significativa entre os tratamentos foi a g19m-95.

Ainda analisando a Tabela 4, verifica-se que, para massa fresca das plantas, os genótipos g1m-95 e g168-99 apresentaram maiores valores no tratamento de 32 horas de exposição ao fungo do que na testemunha. Isso ocorreu devido ao efeito compensação entre plantas, pois na testemunha o número de plantas por vaso foi maior, havendo competição entre elas.

Tabela 4 - Resistência de genótipos de guandu a *Macrophomina phaseolina*, avaliada pelo método de inoculação do fungo nas sementes- 2005.

Genótipo	Porcentagem de plantas sobreviventes*		Massa fresca (g/planta)	
	0 h	32 h	0 h	32 h
g27-94	100 aA	92 abcA	16,07 A	16,62 A
g3-94	88 aA	72 abcdefA	15,72 A	17,69 A
g8-95	100 aA	32 fB	15,62 A	18,73 A
g146-97	96 aA	52 cdefB	15,45 B	21,32 A
g40-95	100 aA	100 aA	15,59 A	16,55 A
g121-99	100 aA	92 abcA	15,76 A	15,05 A
g149-99	88 aA	76 abcdefA	16,92 A	16,78 A
g123-99	56 aA	64 abcdefA	17,05 A	17,94 A
g109-99	100 aA	88 abcdA	16,43 A	16,02 A
g59-95	84 aA	36 efB	13,99 A	16,55 A
g48-95	84 aA	56 cdefB	15,49 A	16,82 A
g138-99	100 aA	60 bcdefB	15,21 A	18,89 A
g154-95	100 aA	100 aA	13,84 A	14,71 A
g124-95	100 aA	86 abA	12,18 A	14,31 A
g119-99	100 aA	84 abcdeB	14,29 A	13,51 A
g10-94	96 aA	48 defB	15,24 A	12,57 A
g18-95	76 aA	44 defB	15,37 A	16,03 A
g47-94	96 aA	80 abcdeA	16,17 A	15,47 A
g186-99	92 aA	88 abcdA	14,87 A	14,66 A
g1m-95	92 aA	56 bcdefB	11,98 B	23,66 A
g19m-95	84 aA	68 abcdefA	16,48 A	11,77 B
g142-95	100 aA	92 abcA	15,39 A	14,96 A
g168-99	72 aA	52 cdefA	10,81 B	17,20 A
g137-99	100 aA	84 abcdA	14,01 A	16,06 A
g108-99	100 aA	96 abA	15,58 A	12,63 A
g167-97	100 aA	84 abcdeB	15,42 A	11,92 A
g58-95	96 aA	88 abcdA	15,04 A	14,67 A
g66-95	100 aA	96 abA	15,04 A	15,75 A
g6-95	100 aA	80 abcdefA	14,36 A	13,70 A
g295-94	100 aA	100 aA	15,97 A	14,37 A
g127-97	100 aA	88 abcA	14,73 A	14,47 A
CV %	18,67			

Médias na coluna e na linha seguidas de mesmas letras minúscula e maiúscula, respectivamente, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Período de condução do ensaio 4: 10/10/2005 - 19/11/2005. * Dados originais.

CONCLUSÕES

- Os genótipos g167-97, g124-95, g27-94, g40-95, g154-95, g127-97 e g9m-97 se mostram resistentes ao isolado de *Macrophomina phaseolina* estudado na maioria dos ensaios.

- O tratamento de 32 horas de exposição das sementes ao fungo permite separar melhor os genótipos de guandu em diferentes graus de resistência.

- Os genótipos que se mostram mais suscetíveis ao isolado de *Macrophomina phaseolina* estudado na maioria dos ensaios são g48-95, g123-95, g8-95, g168-99 e g1m-95.

REFERÊNCIAS

ALVES, S. J.; MEDEIROS, G. B. Leguminosas em renovação de pastagens. In: FAVORETTO, V.; RODRIGUES, L.R.A.; RODRIGUES, T.J.D. (Ed.). **Simpósio sobre ecossistemas de pastagens**. 3. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1997. p. 251-272.

ATHAYDE SOBRINHO, C. **Patossistema Caupi x *Macrophomina phaseolina***: método de detecção em sementes, esporulação e controle do patógeno. 2004. 150 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

BAJPAL, G. C.; SINGH, D. P.; TRIPATHI, H. S. Reaction of pigeon pea cultivars to a sudden appearance of *Macrophomina* stem canker disease at Pantnagar, India. **International Chickpea and Pigeon pea Newsletter**. India, n. 6, p. 41-42, 1999.

BANZATO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 3. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1995, 247 p.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia**: doenças de plantas cultivadas, 4. ed., São Paulo: Agronômica Ceres, 2005, v. 2, cap. 37, p. 333.

BLANCO-LOPÉZ, M. A.; JIMENES-DIAZ, M. A. Effect of irrigation on susceptibility of sunflower to *Macrophomina phaseoli*. **Plant Disease**, Saint-Paul, v. 67, n. 11, p. 1214-1216, 1983.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina***. Viçosa: Imprensa Universitária, 1978, 166 p.

WYLLIE, T. D., CALVERT, O. H. Effect of flower and pod set on formation of sclerotia and infection of *Glycine max* by *Macrophomina phaseoli*. **Phytopathology**, Saint-Paul, v. 59, p. 1243-1245, 1969.

ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G.M. Doenças do feijoeiro e seu controle. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 4, n. 46, p. 50-63, 1978.

CAPÍTULO 4 – CRESCIMENTO MICELIAL E ESPORULAÇÃO DE *Macrophomina phaseolina* EM MEIO DE CULTURA

RESUMO – O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de meios de cultura no crescimento e na esporulação de *Macrophomina phaseolina*. O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 x 4 (meio de cultura x raspagem x discos foliares) com 4 repetições. A parcela experimental constou de uma placa de Petri contendo meio BDA e meio sojinha sobre o qual foram sobrepostos quatro discos de 15 mm de diâmetro de folhas de papel de filtro, milho e guandu. O disco de meio de cultura com crescimento micelial de *M. phaseolina*, antes de serem repicados tiveram o tratamento de raspagem e não raspagem superficial do micélio. No centro de cada placa de Petri foi depositado um disco da colônia do fungo de 4 mm de diâmetro. A testemunha foi composta de placas de Petri com os meios de cultura contendo no centro apenas o disco de colônia do fungo em estudo. O experimento foi mantido em regime de luz contínua e temperatura ambiente. A avaliação foi feita diariamente, medindo-se o crescimento micelial do fungo em 2 diâmetros perpendiculares entre si e os dados foram obtidos através de contagem de conídios com o auxílio de câmara de Neubauer. A sobreposição de discos de folhas de guandu em meio BDA e discos de papel de filtro em meio sojinha foram os tratamentos que proporcionaram melhor esporulação do fungo nas condições do experimento. O tratamento com sobreposição de discos de milho nos dois tipos de meio de cultura foi o que menos proporcionou esporulação do fungo. Para crescimento micelial não houve diferença significativa entre os tratamentos.

PALAVRAS-CHAVE: crescimento micelial, esporulação, *Macrophomina phaseolina*

ABSTRACT – MYCELIAL GROWTH AND SPORULATION OF *Macrophomina phaseolina* MIDDLE OF CULTURE

The present work had the objective of evaluating the effect of culture media in the mycelial growth and in the sporulation of *Macrophomina phaseolina*. The experiment was carried out in a completely randomized design in factorial project 2 x 2 x 4 (middle of culture x scratching x disks foliate) with 4 repetitions. The experimental portion consisted of a plate of Petri half containing BDA and half sojinha on which four disks of 15 mm of diameter of leaves of filter paper, corn and pigeon pea were put upon. Superficial scratching and non scratching treatments were performed on the micelia on the culture media disk. In the center of each plate a disk of grown micelia was deposited in a 4 mm BDA culture media. Petri dishes with the culture media containing the four disks of growth micelial, without the addition of any disk of the different hosts were used as controls. The experiment was maintained in continuous light and environment temperature. The evaluation was made in the 10^o day of incubation and the data were obtained through conidiosporos count with the aid of a Neubauer camera. The superposition of the leaf disks of pigeon pea in BDA and disks of filter paper in sojinha were the treatments that provided better sporulation level in the conditions of that experiment were half half. The treatment with superposition of corn disks in the two types of culture media was the less effective for fungus sporulation.

KEYWORDS: mycelial growth, sporulation, *Macrophomina phaseolina*

INTRODUÇÃO

O fungo *Macrophomina phaseolina* apresenta várias sinonímias como *M. phaseoli*, *M. cajani*, *M. sesami*, *Rhizoctonia bataticola* e *Sclerotium bataticola* entre outras (SARTORATO & RAVA, 1994). A explicação para essa grande variação de gêneros pode ser devido ao fato de o fungo apresentar estádios picnidial e esclerodial bem definidos (DHINGRA & SINCLAIR, 1978). Os autores comentam ainda que o estádio picnidial do fungo foi relatado antes do estádio esclerodial.

Quanto a classificação da espécie, *M. phaseolina* está ordenada na Subdivisão Deuteromycotina, na Família Sphaeropsidaceae (MENEZES & OLIVEIRA, 1993) e é a única espécie que representa o gênero *Macrophomina*. Parasita mais de 500 espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas (WYLLIE & CALVERT, 1969), é habitante natural do solo, de grande variabilidade patogênica e alta capacidade de sobrevivência sob condições adversas. É favorecida por condições de alta temperatura e baixa umidade do solo, ou seja, clima quente e períodos de seca.

É um fungo polífago e cosmopolita que ataca inúmeras espécies de plantas cultivadas como: milho, soja, sorgo, amendoim, caupi, gergelim, feijão entre outras (MACHADO, 1980). Sobrevive de um ano para o outro em restos de culturas e hospedeiros devido sua capacidade saprofítica e formação de microescleródios que ficam viáveis no solo (KIMATI, 2005). De acordo com ANDRUS (1938) e SANTOS et al. (1984), para quase todas essas espécies de plantas citadas acima, o fungo é eficientemente transmitido por sementes. Levando-se em conta que é um fungo que pode ser transmitido via semente, quando isolado e cultivado em laboratório, pode perder a capacidade de esporulação (SRINIVASAN et al., 1971).

Como o fungo *M. phaseolina* possui baixa capacidade de esporulação, alguns pesquisadores têm utilizado recursos alternativos visando minimizar o problema, utilizando extratos ou partes de plantas hospedeiras adicionados ao meio de cultura (CHIDAMBARAM & MATHUR, 1975; MACHADO, 1980; SRINIVASAN et al., 1971). Para a esporulação de *M. phaseolina*, o substrato de crescimento, o fotoperíodo e a qualidade da luz são fatores importantes no processo reprodutivo (MACHADO, 1980).

CHIDAMBARAM & MATHUR (1975) estudando diferentes isolados de *M. phaseolina* de diferentes hospedeiros, compararam meios de cultura contendo folhas de alguns cereais e observaram bons resultados quanto à produção de picnídios férteis do fungo. Maiores quantidades de picnídios foram conseguidas quando as colônias fúngicas foram colocadas em meio agarizado contendo folhas de trigo.

SMITH JÚNIOR (1964), estudando o efeito da temperatura no crescimento do fungo em meio de cultura, verificou que as flutuações de temperatura têm efeito significativo no seu crescimento. DHAR et al. (1991) observaram que maiores taxas de esporulação de *Rhizoctonia bataticola* (= *Macrophomina phaseolina*) foram obtidas sob exposição diária de luz alternada (12h luz/12h escuro) e que o aumento do período de escuro inibiu o processo de esporulação. O mesmo foi observado por MACHADO (1980), que destaca ainda que alguns isolados só conseguiram esporular quando houve presença de luz contínua.

Repicagens sucessivas do fungo em meio de cultura podem resultar em perda de patogenicidade (DHINGRA & SINCLAIR, 1978). Fatores ambientais como meio de cultura, sobreposição de papel de filtro na superfície do meio e luz contínua são importantes para a esporulação do fungo *M. phaseolina* (MACHADO, 1980).

ATHAYDE SOBRINHO et al. (2003) trabalhando com isolados de *M. phaseolina*, observaram a dificuldade em inocular plantas de caupi com o patógeno, devido a ausência de produção de conídios em cultivos artificiais.

Isolados de *Sclerotium bataticola* apresentaram diferentes graus de patogenicidade em plantas de girassol. Essa patogenicidade aumenta com o aumento da temperatura (MATHUR & SACKSTON, 1963).

Portanto, o presente trabalho teve por objetivo estudar o efeito de dois meios de cultura e superposição aos meios de discos foliares de plantas milho, guandu, papel de filtro, sobre a esporulação do fungo *M. phaseolina*.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Fitossanidade da FCAV – UNESP, em Jaboticabal/SP, em setembro de 2005.

Para a realização do estudo foi utilizado o isolado de soja, obtido a partir de planta morta pelo fungo *Macrophomina phaseolina*.

O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 x 4 (meio de cultura x raspagem x discos foliares) com 4 repetições. A parcela experimental constou de uma placa de Petri contendo meios de cultura: BDA (caldo de 200g de batata; 20g de dextrose e 20g de agar em 1000 mL de água) e meio sojinha (40g de farinha de soja; 20g de dextrose e 20g de ágar em 1000 mL de água). Os tratamentos testados foram: 1. BDA + 4 discos de folha de milho; 2. BDA + 4 discos de folha de guandu; 3. BDA + folha de papel de filtro (8,5 cm de diâmetro). Os mesmos tratamentos foram repetidos com meio sojinha. Cada tratamento foi repetido com disco de colônia do fungo com e sem raspagem na superfície. A raspagem do micélio do fungo em meio de cultura foi feita com auxílio uma lâmina usada em microscopia. Os discos de folhas foram de 15 mm de diâmetro. No centro de cada placa de Petri contendo meio de cultura foi depositado um disco de colônias do fungo de 4 mm de diâmetro com 5 dias de idade, do isolado de *M. phaseolina* de plantas de soja. Foi utilizada temperatura ambiente para incubação do fungo e regime de luz contínua (fluorescentes brancas do tipo luz do dia). A testemunha constou somente da utilização dos meios de cultura sem a adição de qualquer disco.

A avaliação foi realizada 10 dias após a incubação do fungo. Para isso discos de 15 mm de diâmetro foram retirados e macerados em 5 mL de água destilada para

liberação dos conídios. Essa suspensão foi filtrada em gaze e posteriormente foi feita a contagem dos conídios em câmara de Neubauer. Os dados foram obtidos através da estimativa da média do número de conídios presentes em cada um dos dois campos da câmara de Neubauer. Para a avaliação do crescimento micelial foi feita a medição diária do tamanho das colônias até o fechamento total da placa.

Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, de acordo com o relatado por BANZATO & KRONKA (1995), com a utilização do programa ESTAT desenvolvido pelo Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP – Câmpus de Jaboticabal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância mostrou efeito significativo para os fatores discos foliares e interação meio de cultura x discos foliares (Tabela 1).

Tabela 1 – Quadro de análise de variância para esporulação de *Macrophomina phaseolina* em dois meios de cultura, com e sem raspagem do micélio, e em diferentes discos foliares.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Meio de cultura (MC)	1	1,33	1,33	0,35 ^{NS}
Raspagem (R)	1	3,62	3,62	0,95 ^{NS}
Discos foliares (D)	3	65,04	21,68	5,72 ^{**}
MC x R	1	10,17	10,17	2,68 ^{NS}
MC x D	3	39,99	13,33	3,52 [*]
R x D	3	10,24	3,41	0,80 ^{NS}
MC x R x D	3	7,73	2,58	0,68 ^{NS}
Tratamento	15	138,13	9,21	
Resíduo	48	182,03	3,80	

De acordo com os dados contidos na Tabela 2 pode-se verificar que o fator discos foliares foi significativo, ou seja, sendo obtido melhor esporulação do fungo com discos foliares de guandu, que estatisticamente não diferiu do tratamento com folha de papel de filtro.

Tabela 2 – Efeito da sobreposição de meios de cultura com folha de papel de filtro e discos foliares de milho e guandu na esporulação de *Macrophomina phaseolina*

	Meio sem disco	Folha de papel de filtro	Discos de folha de milho	Discos de folha guandu
	x 10 ⁴ conídios.mL ⁻¹			
Esporulação	2,18 B	2,89 AB	1,87 B	4,48 A
CV %	68,14			

Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao 5% de probabilidade.

De acordo com a Tabela 3 os tratamentos que proporcionaram maior esporulação do fungo foram os que utilizaram meio BDA com adição de discos foliares de guandu e meio sojinha com adição de folhas de papel de filtro. Esse último não diferiu estatisticamente dos tratamentos sem adição de discos e com adição de discos foliares de guandu. MACHADO (1980) relata que o aumento da esporulação em folhas de papel de filtro, pode ser devido à utilização da celulose pelo fungo. Ainda em relação ao papel de filtro, REIS (1973) relata que esse pode alterar a topografia do meio através do aumento da superfície de contato do fungo com o mesmo.

ATHAYDE SOBRINHO (2004) estudando efeitos de discos foliares de diferentes hospedeiros sobre a esporulação do fungo observou que a sobreposição de discos de folhas de trigo ao meio BDA foi o responsável pelo aumento da esporulação. Conclui ainda que a combinação de discos foliares de trigo com temperatura de 25°C foi o que apresentou melhor resultado. Outros autores obtiveram o mesmo resultado quando

estudaram efeito do emprego de folhas de trigo, aveia, cevada, sorgo e milho, adicionados ao meio de cultivo. Concluíram que, para alguns isolados, as maiores taxas de produção de picnídios foram obtidas com a adição de folhas de trigo (CHIDAMBARAM & MATHUR, 1975).

Fungos da ordem Sphaeorderosidales apresentam comportamento diferenciado ao serem submetidos a variações na qualidade nutricional do meio de cultivo. A transferência de um meio rico para um meio pobre é um estímulo para a esporulação. Ao entrarem em contato com os discos foliares, passam a se nutrir a partir desse substrato, onde os nutrientes encontram-se pouco disponíveis, isso faz com que o fungo seja estimulado a se reproduzir (Hawer, 1957 e Hawer, 1966), citados por ATHAYDE SOBRINHO, 2004).

ASHWORTH JR.(1959) observou que as melhores taxas de esporulação são conseguidas quando o fungo é cultivado em condições ambiente, onde há uma variação de temperatura diariamente.

Em relação ao tratamento com discos de folha de milho, a esporulação foi baixa nos dois meios de cultura testados, ou seja, foi o pior tratamento. O mesmo não foi observado por ATHAYDE SOBRINHO (2004) que obteve o melhor resultado com o emprego de discos de folhas de milho em meio de cultura, a uma temperatura de 25°C. Em relação ao crescimento micelial (dados não apresentados) não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Tabela 3 – Efeito da sobreposição de folhas de papel de filtro e discos de foliares e de meio de cultura na esporulação de *Macrophomina phaseolina* (Desdobramento da interação de meios de cultura x discos foliares).

	Sem disco	Papel de filtro	Milho	Guandu
	$\times 10^4$ conídios.mL ⁻¹			
Meio BDA	1,93 aB	1,51 bB	2,23 aB	5,18 aA
Meio sojinha	2,44 aAB	4,27 aA	1,51 aB	3,79 aAB
CV %	68,14			

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

CONCLUSÃO

- A sobreposição de discos foliares de guandu em meio BDA e folha de papel de filtro em meio sojinha proporcionam um incremento na esporulação de *Macrophomina phaseolina*.

REFERÊNCIAS

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

ASHWORTH JR., L. J. Environmental and inherent factors that influence sporulation of *Macrophomina phaseoli*. **Phytopathology**, Saint-Paul, v. 49, p.533, 1959. Abstract.

ATHAYDE SOBRINHO, C. **Patossistema Caupi x *Macrophomina phaseolina***: método de detecção em sementes, esporulação e controle do patógeno. 2004. 150 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

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**, Botucatu, v. 29, n. 1, p. 79, 2003.

BANZATO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 3. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1995, 247 p.

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

DHAR, V.; SARBHOY, A. K.; DHAR, V. Induced pycnidia production by the soybean isolates of *Rhizoctonia bataticola*. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 44, n. 2, p. 68-72, 1991.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1978. 166 p.

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

MATHUR, S. B.; SACKSTON, W. E. Effect of temperature and age of host on infection of sunflowers by *Sclerotium bataticola*. **Phytopathology**, Saint-Paul, v. 3, p. 350, 1963. Abstract.

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

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

SANTOS, A. F.; ATHAYDE, J. T.; DAN, E. L. Microflora associada às sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) no Estado do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 9, n. 3, p. 379, 1984.

SARTORATO, A.; RAVA, C. A. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília. EMBRAPA – SPI, 1994, p. 143.

SMITH JÚNIOR, R. Effect of diurnal temperature fluctuations on linear growth rate of *Macrophomina phaseolina* in culture. **Phytopathology**, Saint-Paul, v. 54, p. 849-852, 1964.

SRINIVASAN, M. C.; CHIDAMBARAM, 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.

WYLLIE, T. D., CALVERT, O. H. Effect of flower and pod set on formation of sclerotia and infection of *Glycine max* by *Macrophomina phaseoli*. **Phytopathology**, Saint-Paul, v. 59, p. 1243-1245, 1969.