

GUIA PRÁTICO PARA IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS MAIS FREQUENTES EM SEMENTES DE SOJA

Ademir Assis Henning

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

GUIA PRÁTICO PARA IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS MAIS FREQUENTES EM SEMENTES DE SOJA

Ademir Assis Henning

*Embrapa
Brasília, DF
2015*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Soja

Rod. Carlos João Strass, s/n, Distrito de Warta - Londrina, PR

Caixa Postal 231

CEP 86001-970

Fone: (43) 3371 6000

Fax: (43) 3371 6100

www.embrapa.br

www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

Unidade responsável pelo conteúdo e edição

Embrapa Soja

Comitê de Publicações da Embrapa Soja

Presidente: *Ricardo Vilela Abdelnoor*

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

Membros: *Alvadi Antonio Balbinot Junior, Claudine Dinali Santos Seixas, Eliseu Binneck, Fernando Augusto Henning, Liliane Márcia Hertz Henning, Maria Cristina Neves de Oliveira, Norman Neumaier e Vera de Toledo Benassi.*

Colaboração: *Agnes Izumi Nagashima*

Supervisão editorial: *Vanessa Fuzinato Dall´Agnol*

Normalização bibliográfica: *Ademir Benedito Alves de Lima*

Editoração eletrônica e Capa: *Vanessa Fuzinato Dall´Agnol*

Fotos da capa (sentido horário): *Álvaro Manoel Rodrigues Almeida, Agnes Izumi Nagashima e Ademir Assis Hennning.*

1ª Edição

Versão *on-line*: 2015

Todos os direitos reservados.

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Soja

Henning, Ademir Assis.

Guia prático para identificação de fungos mais frequentes em sementes de soja / Ademir Assis Henning. – Brasília, DF : Embrapa, 2015.

33 p. : il. color. ; 14 cm x 21 cm.

ISBN 978-85-7035-441-9

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

CDD 633.3494

AUTOR

ADEMIR ASSIS HENNING

Engenheiro Agrônomo, Ph.D. em Agronomia,
pesquisador da Embrapa Soja, Londrina, PR

APRESENTAÇÃO

Este manual é direcionado aos técnicos que atuam nos laboratórios de análise de sanidade de sementes de soja. As fotografias e os desenhos das estruturas dos principais fungos que ocorrem nas sementes de soja são bastante ilustrativos e permitem ao analista fazer a identificação dos patógenos com segurança. Para facilitar o entendimento, os microrganismos (fungos principalmente) foram classificados em três grupos: i) patógenos importantes (fitopatógenos); ii) fungos de armazenamento e iii) contaminantes e/ou saprófitas.

A análise sanitária da semente, além de fornecer subsídios para indicar o melhor tratamento com fungicidas, juntamente com o teste de tetrazólio (DIACOM – diagnóstico completo da qualidade da semente), pode fornecer informações importantes acerca dos problemas de baixa qualidade da semente, possibilitando sua identificação e a tomada de decisões para corrigir suas causas.

Ricardo Vilela Abdelnoor

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Embrapa Soja

SUMÁRIO

1. MÉTODO DO PAPEL DE FILTRO (<i>BLOTTER TEST</i>).....	9
1.1. Materiais necessários.....	10
1.2. Metodologia.....	11
2. PATÓGENOS IMPORTANTES	12
2.1) <i>Cercospora kikuchii</i>	12
2.2) <i>Colletotrichum truncatum</i>	13
2.3) <i>Fusarium</i> spp.....	15
2.4) <i>Macrophomina phaseolina</i>	16
2.5) <i>Phomopsis</i> sp.....	18
2.6) <i>Rhizoctonia solani</i>	19
2.7) <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - Mofo branco	20
2.8) <i>Sclerotium rolfsii</i>	21
3. FUNGOS DE ARMAZENAMENTO	22
3.1) <i>Aspergillus</i> spp.	22
3.2) <i>Penicillium</i> sp.	23
4. CONTAMINANTES OU SAPRÓFITAS.....	24
4.1) <i>Alternaria</i> spp.....	24
4.2) Bactérias	25
4.3) <i>Botryodiplodia</i> sp.	26
4.4) <i>Chaetomium</i> sp.	27
4.5) <i>Cladosporium</i> spp.....	28
4.6) <i>Rhizopus</i> spp.....	29
4.7) <i>Trichoderma</i> spp.....	31
REFERÊNCIAS.....	32
Anexo (Ficha para avaliação de análise sanitária).....	33

1. MÉTODO DO PAPEL DE FILTRO (BLOTTER TEST)

Fotos: Agnes Izumi Nagashima e Samantha Rigo Segalin

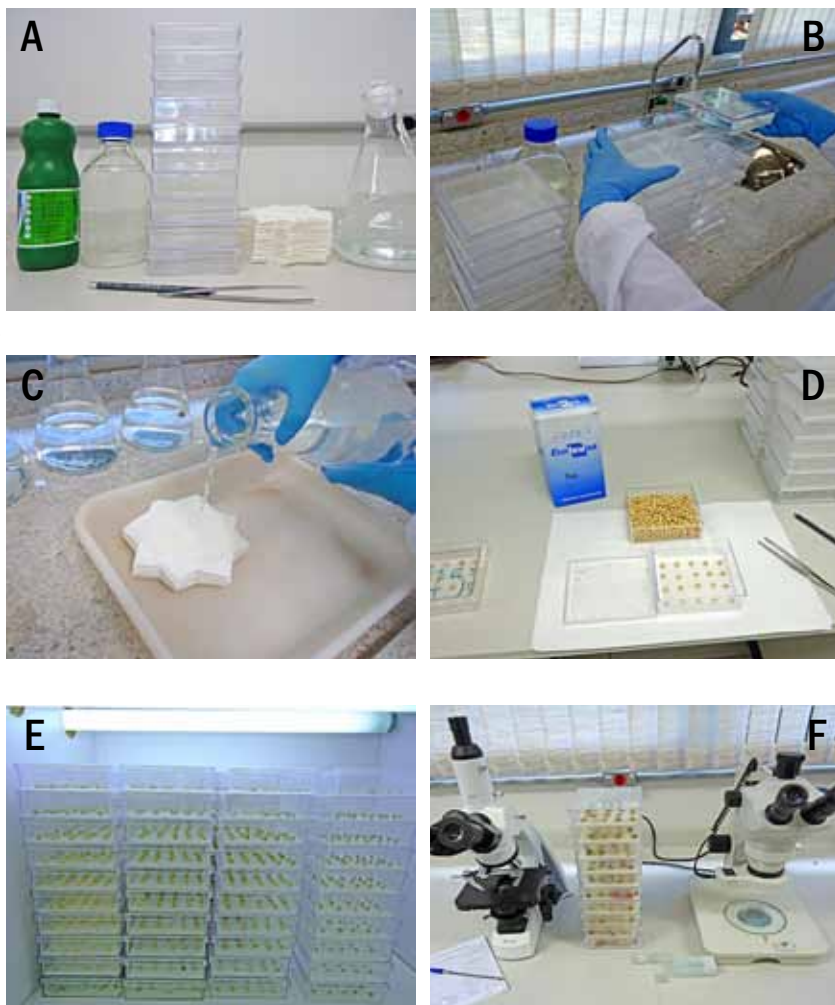


Figura 1. Montagem do método do papel de filtro. A) materiais a serem utilizados; B) desinfestação dos gerbox com NaOCl 1,05%; C) água destilada autoclavada para umedecer o papel de filtro esterilizado; D) vinte sementes por gerbox; E) amostras na câmara de incubação a 20 ± 2 °C por 7 dias; F) avaliação dos patógenos e saprófitas.

1.1. MATERIAIS NECESSÁRIOS

- Caixas plásticas (gerbox) com dimensões 11,5 x 11,5 x 3,5 cm (Figura 1 A)
- Papel de filtro qualitativo 80 g/m², quatro folhas 3,5 x 3,5 cm esterilizado em estufa a 160 °C por 20 min (Figuras 1A e 1C)
- Água destilada e autoclavada (de preferência) ou esterilizada em micro-ondas (Figuras 1A e 1C)
- Pinças retas, estiletes, vidros conta gotas com água e com lactofenol com corante, lâminas e lamínulas de vidro, lenço de papel ou papel higiênico fino (Figuras 1D e 1F)
- Microscópio biológico com aumento no mínimo até (400 x) (Figura 1F)
- Microscópio estereoscópico com aumento de no mínimo até (50 x) (Figura 1F)
- Água sanitária contendo 20% hipoclorito de sódio (NaOCl 1,05%) para desinfestar gerbox (Figuras 1A e 1B)
- Luvas (nitrílicas) de borracha, antiderrapantes ou luvas cirúrgicas (Fig. 1B e 1C)
- Lápis cópia (Figura 1D)
- Avental (guarda-pó) (Figura 1B)
- Câmara de incubação a 20°C ± 2°C com luz branca fluorescente (ou NUV) (Figura 1E) .

1.2. METODOLOGIA

O principal método utilizado na análise de sementes de soja é o do papel de filtro (*Blotter*). A experiência tem comprovado que este método é perfeitamente viável, sendo o mais eficaz para a cultura (HENNING, 2005). Em casos específicos, o método pode ser alterado, variando a temperatura e o período de incubação, para detectar patógenos importantes 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% (água sanitária 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 abrí-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, evitando 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 (REGRAS..., 2009).

A avaliação é feita em cada semente, sendo anotada em ficha apropriada a ocorrência dos diversos patógenos. *Aspergillus flavus* e *Penicillium* spp., apesar de serem 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).

2. PATÓGENOS IMPORTANTES

2.1. *Cercospora kikuchii*

Muito comum em sementes, não afeta a germinação e o vigor.

Fotos: Agnes Izumi Nagashima

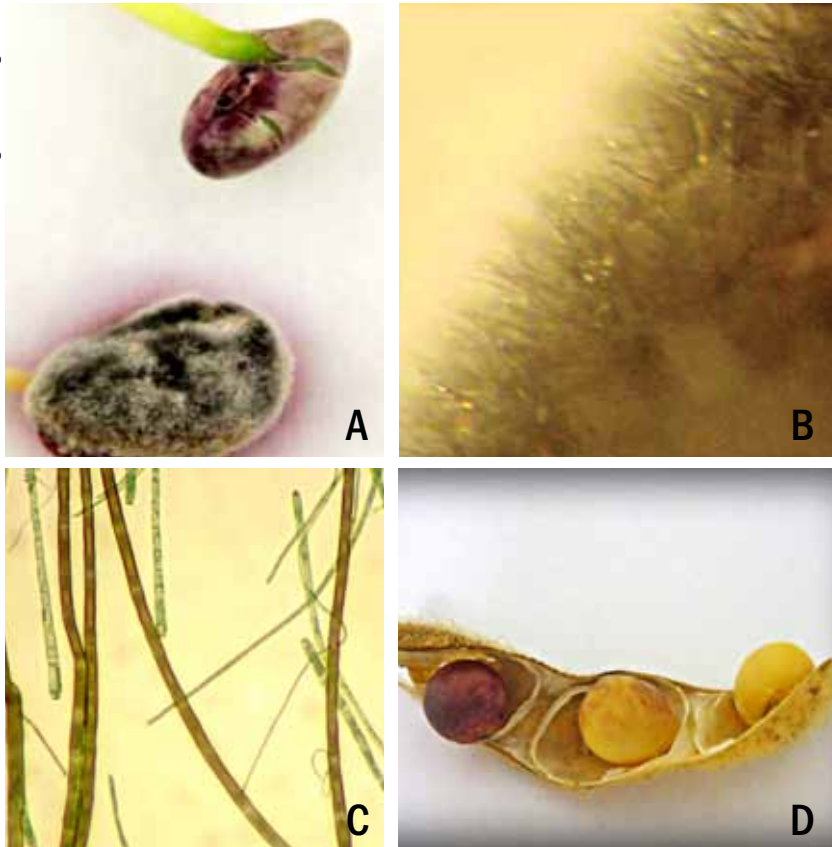


Figura 2. *Cercospora kikuchii*. A) semente com sintoma de mancha púrpura; B) esporulação do fungo (conidióforos e conídios) sobre a semente; C) conídios (tingidos) e conidióforos (marrons); D) semente infectada na vagem.

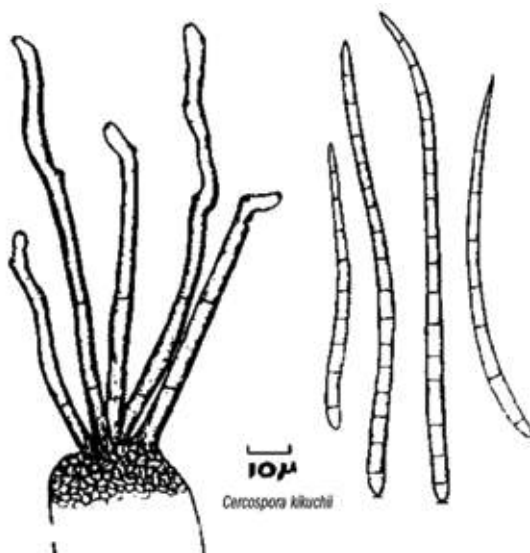
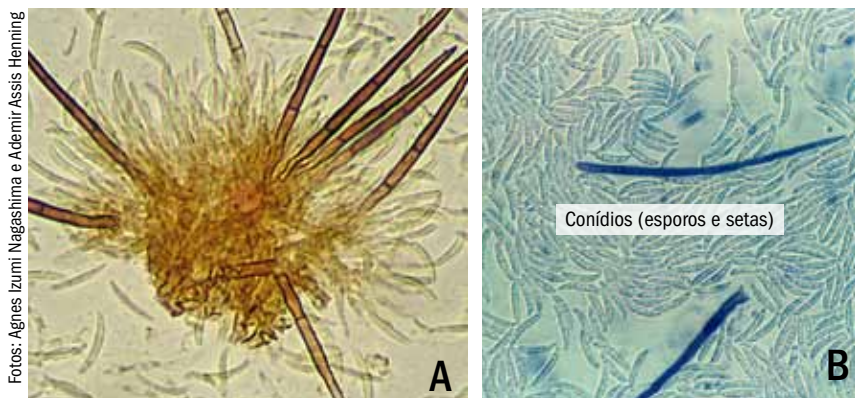


Figura 3. Conidióforos (esquerda) e conídios ou esporos multi-septados à direita.

Fonte: Sinclair e Shurtleff (1975).

2.2. *Colletotrichum truncatum*

Agente causal da antracnose.



Fotos: Agnes Izumi Nagashima e Ademir Assis Henning

Figura 4. *Colletotrichum truncatum*. A e B) Conídios (esporos) e setas de *Colletotrichum truncatum*.

Fotos: Agnes Izumi Nagashima (A) e Ademir Assis Henning (B e C)

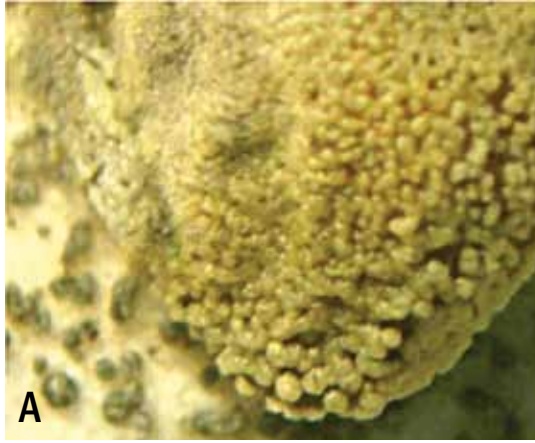


Figura 5. *Colletotrichum truncatum*. A) Semente com acérvulos, massa de esporos; B) acérvulos com setas e massa de esporos (creme) sobre o tegumento da semente; C) radícula apresentando vários acérvulos com as setas.

2.3. *Fusarium* spp.

Fusarium graminearum e *Fusarium pallidoroseum* (*F. semitectum*) são as duas espécies mais frequentes em sementes de soja. Podem prejudicar a germinação no laboratório mas não são patogênicos às plantas!

Fotos: Agnes Izumi Nagashima

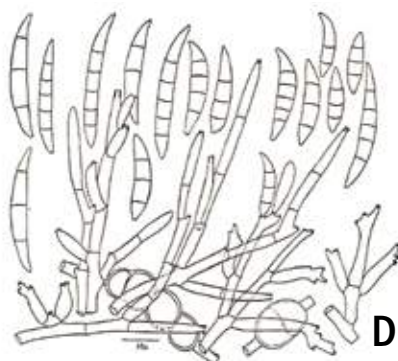
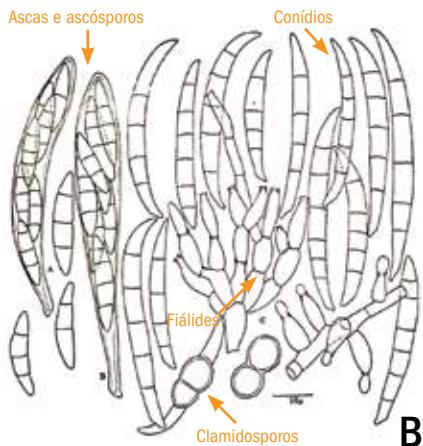


Figura 6. *Fusarium* spp. A) *Fusarium graminearum*; B) Conidióforos, conídios, ascas, clamidosporos de *Fusarium graminearum*; C) *Fusarium pallidoroseum*; D) Conidióforos, conídios e clamidosporos de *Fusarium pallidoroseum*.

Fonte: Booth (1971).

2.4. *Macrophomina phaseolina*

Fungo de solo, pode eventualmente contaminar as sementes.

Foto: Agnes Izumi Nagashima



Figura 7. Conídios (esporos) de *Macrophomina phaseolina*.

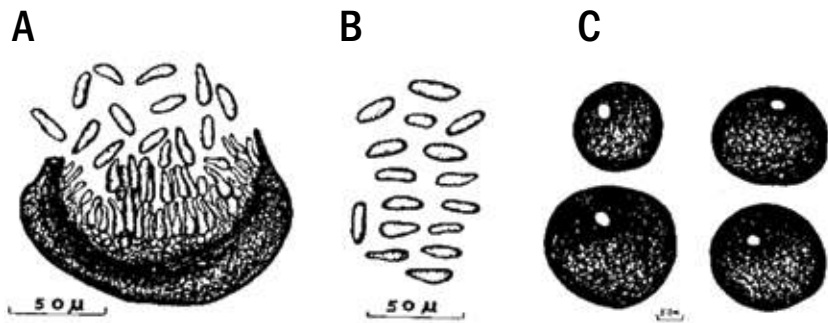


Figura 8. *Macrophomina phaseolina*. A) corte de picnídio com esporos; B) esporos; C) picnídios.

Fonte: Sinclair e Shurtleff (1975).

Fotos: Agnes Izumi Magashima

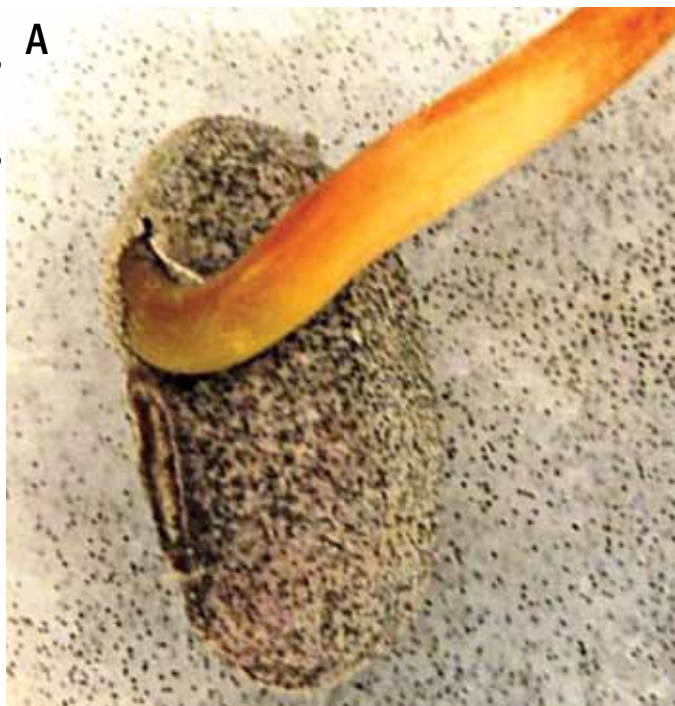


Figura 9. *Macrophomina phaseolina*. A) Microescleródios espalhados sobre o papel de filtro; B) semente infectada com *Macrophomina phaseolina*.

2.5. *Phomopsis* sp.

É o principal patógeno em sementes de soja. Juntamente com *Fusarium pallidoroseum* (*F. semitectum*) pode afetar a germinação da semente no teste do rolo de papel. São frequentes quando as fases de maturação e/ou colheita coincidem com períodos de alta umidade (chuvas).

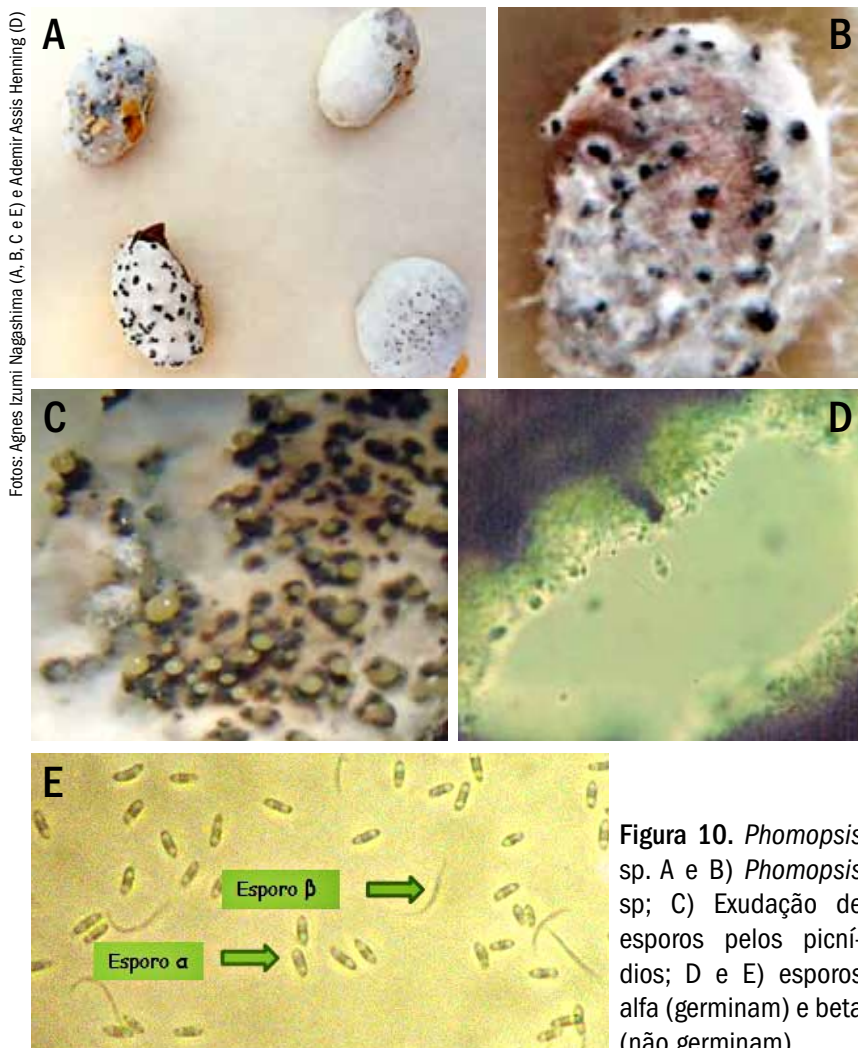


Figura 10. *Phomopsis* sp. A e B) *Phomopsis* sp; C) Exudação de esporos pelos picnídios; D e E) esporos alfa (germinam) e beta (não germinam).

2.6. *Rhizoctonia solani*

Fungo de solo pode eventualmente contaminar as sementes.

Fotos: Ademir Assis Henning

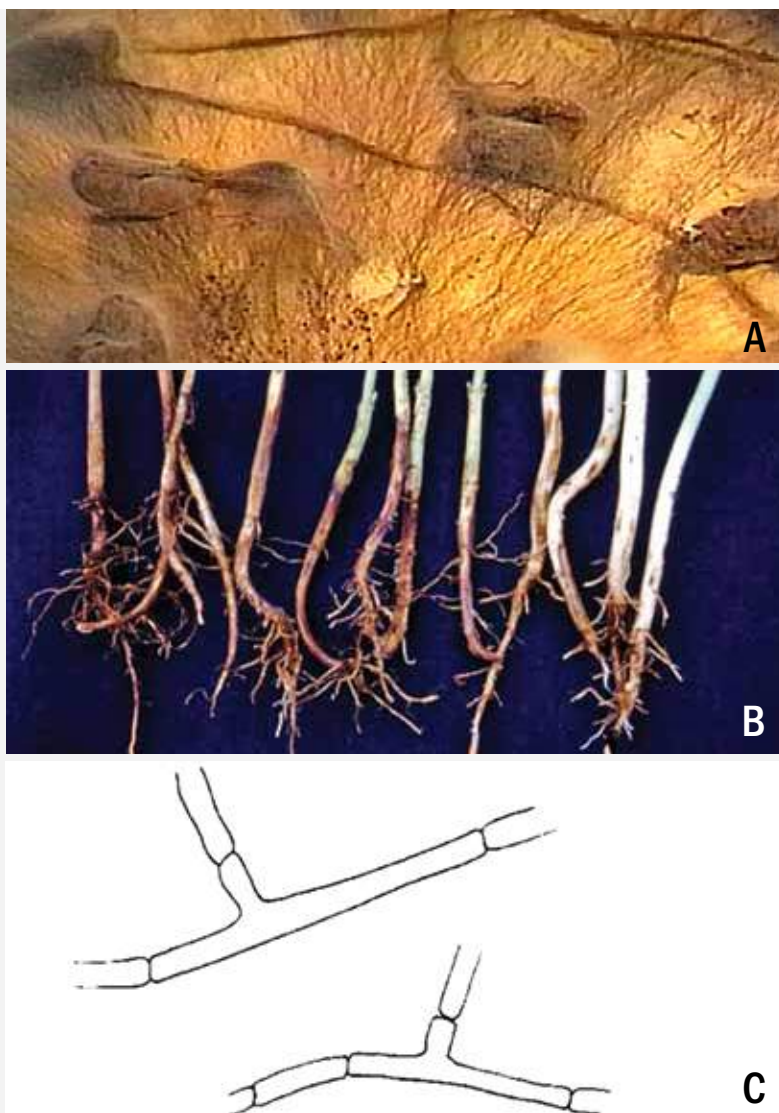


Figura 11. *Rhizoctonia solani*. A) “Rizomorfas” em método de papel de filtro; B) sintomas em planta; C) Hifas septadas e ramificadas a 90°.

Fonte: Henning et. al (2002).

2.7. *Sclerotinia sclerotiorum* - Mofo branco

Baixa taxa de transmissão pela semente ($< 0,1\%$). O problema maior são os escleródios (negros de formato irregular) misturados às sementes.

Fotos: Ademir Assis Henning

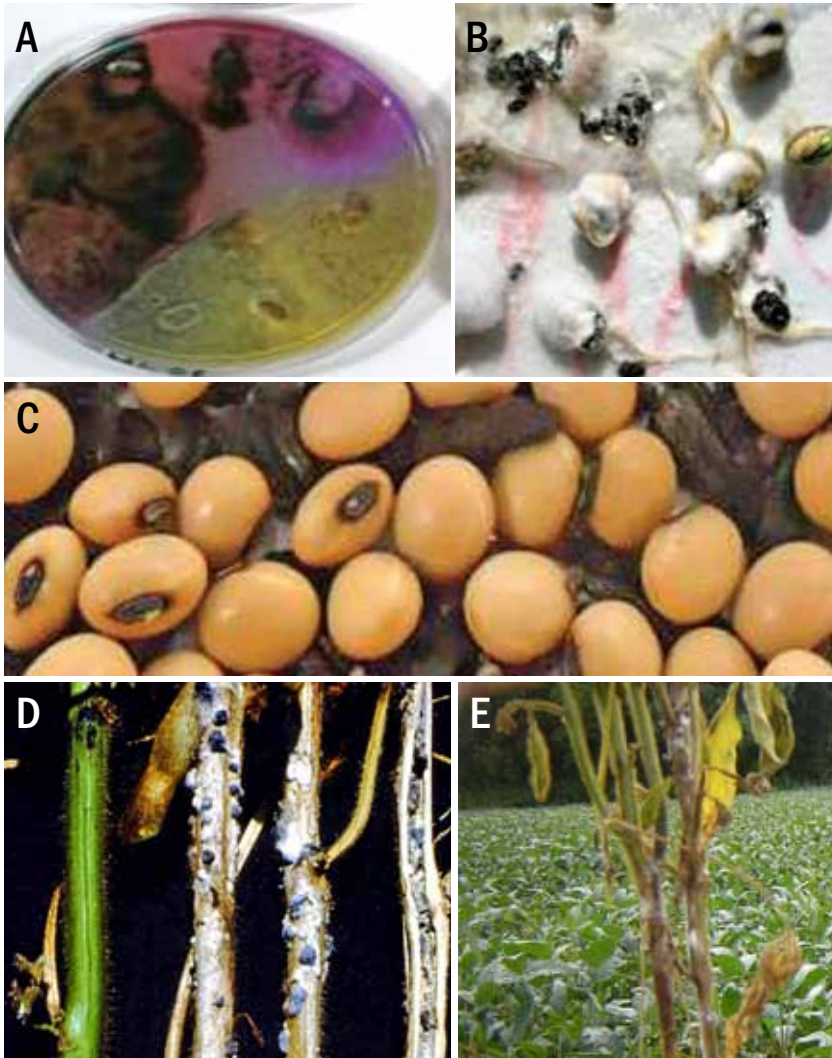


Figura 12. *Sclerotinia sclerotiorum*. A) Placa do método do Neon; B) escleródios em gerbox no método do papel de filtro; C) escleródios misturados às sementes; D) hastes com escleródios e E) sintoma em planta no campo.

2.8. *Sclerotium rolfsii*

Fungo de solo, pode aparecer em lotes de sementes. Produz escleródios pequenos, marrons escuros (quando maduros), semelhantes a sementes de repolho.

Fotos: Agnes Izumi Nagashima (A e B) e Álvaro Manoel Rodrigues Almeida (C e D)

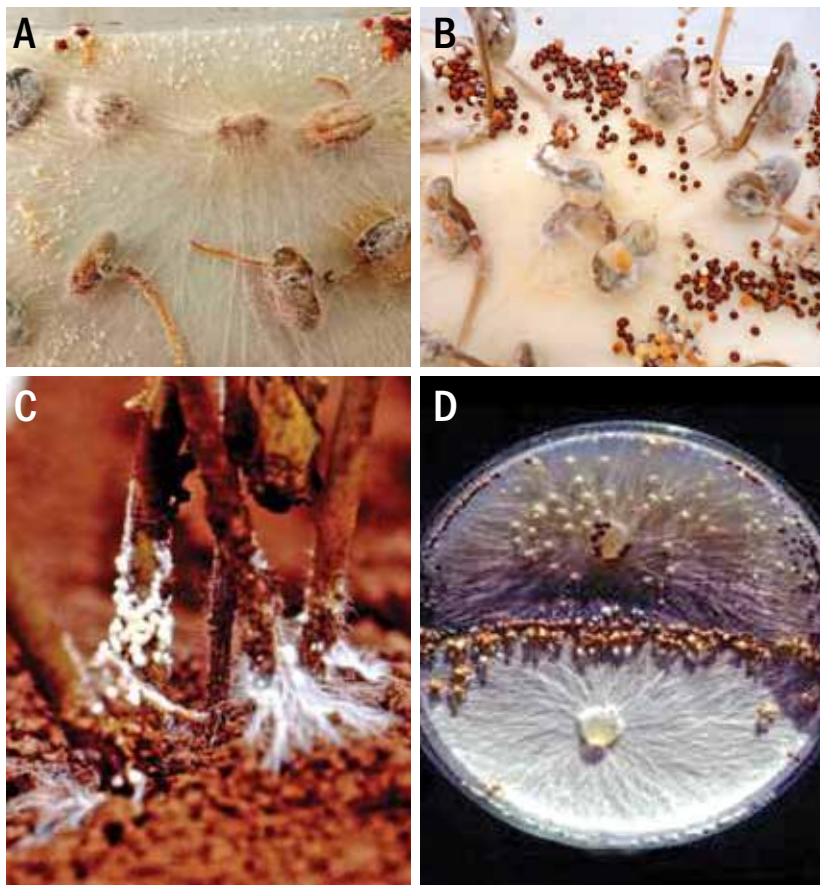


Figura 13. *Sclerotium rolfsii*. A e B) Produção de escleródios em método do papel de filtro; C) sintomas em plântulas e D) escleródios em placa com meio.

3. FUNGOS DE ARMAZENAMENTO

3.1. *Aspergillus* spp.

Fungo de armazenamento, sendo que a espécie mais comum é *Aspergillus flavus*.

Fotos: Agnes Izumi Nagashima

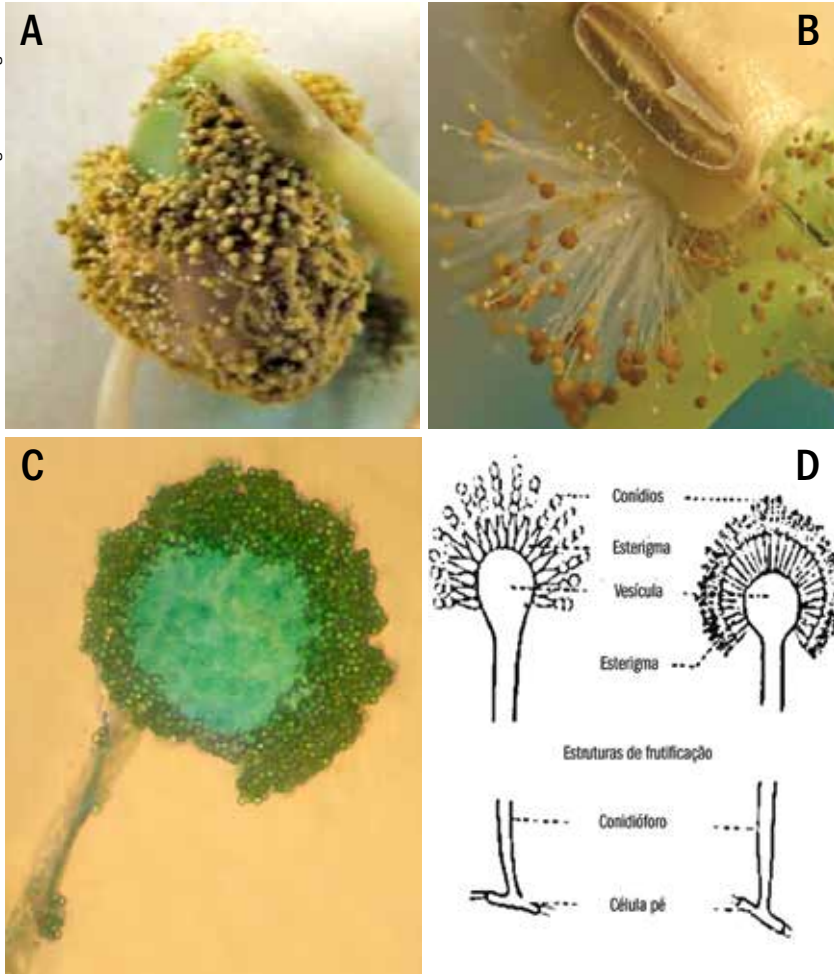


Figura 14. A) *Aspergillus* spp. B) *Aspergillus flavus*; C) estruturas de *Aspergillus flavus* em visualização microscópica (400 x); D) estruturas de frutificação de *Aspergillus flavus*.

Fonte: Silveira (1968).

3.2. *Penicillium* sp.

Fungo de armazenamento, porém menos frequente que *Aspergillus* spp. em sementes de soja.

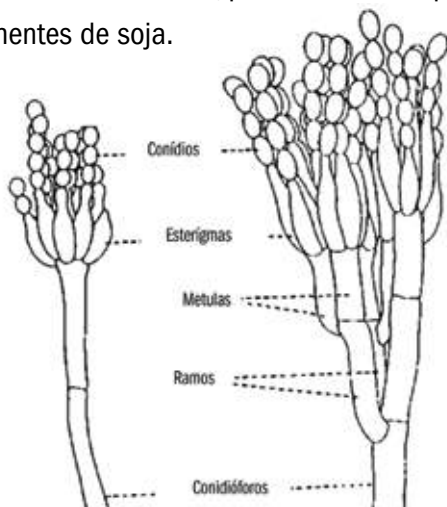


Figura 15. Estruturas de *Penicillium* sp.

Fonte: Silveira (1968).

Fotos: Ademir Assis Henning

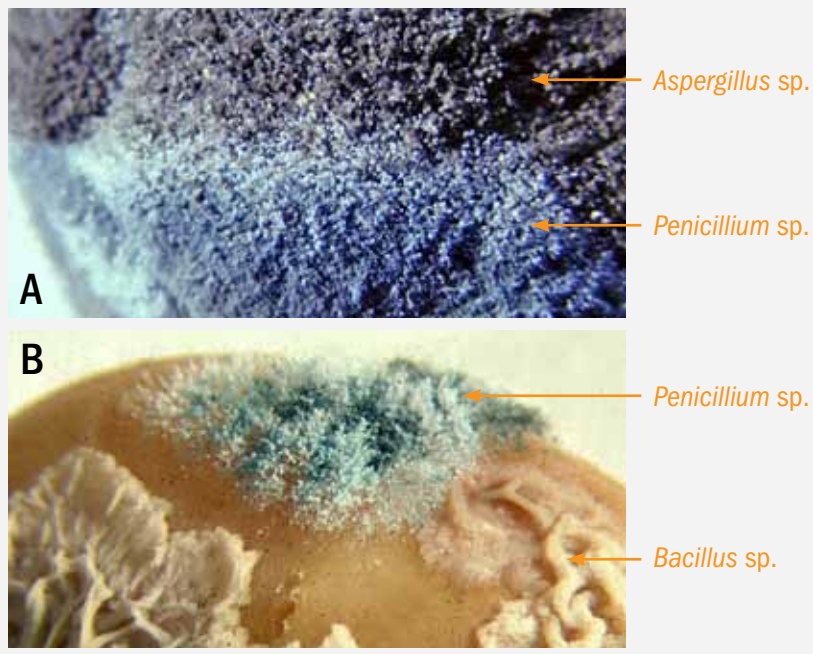


Figura 16. *Penicillium* sp. A) Semente com *Penicillium* sp.; B) *Penicillium* sp. em semente com *Bacillus* sp.

4. CONTAMINANTES OU SAPRÓFITAS

4.1. *Alternaria* spp.

Saprófita, as espécies encontradas mais comumente são *Alternaria tenuis* ou *Alternaria alternata*.

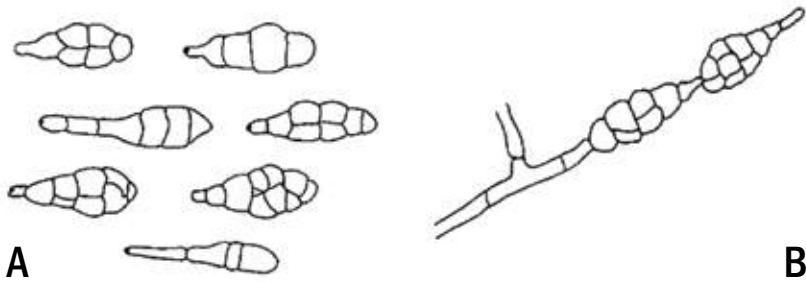


Figura 17. *Alternaria* sp. A) Diferentes formas de conídios (esporos) com septos transversais e longitudinais; B) esporos em cadeia (catenulados).

Fonte: Henning et al. (2002)

Fotos: Agnes Izumi Nagashima

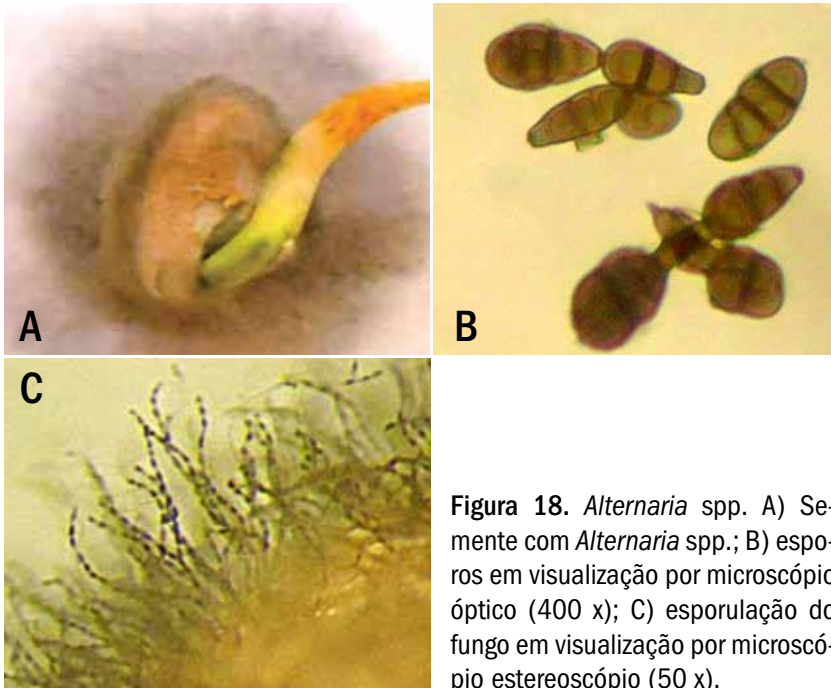


Figura 18. *Alternaria* spp. A) Semente com *Alternaria* spp.; B) esporos em visualização por microscópio óptico (400 x); C) esporulação do fungo em visualização por microscópio estereoscópio (50 x).

4.2. Bactérias

Saprófitas, algumas espécies são utilizadas no controle biológico de patógenos importantes.

Fotos: Agnes Izumi Nagashima e Ademir Assis Hemming

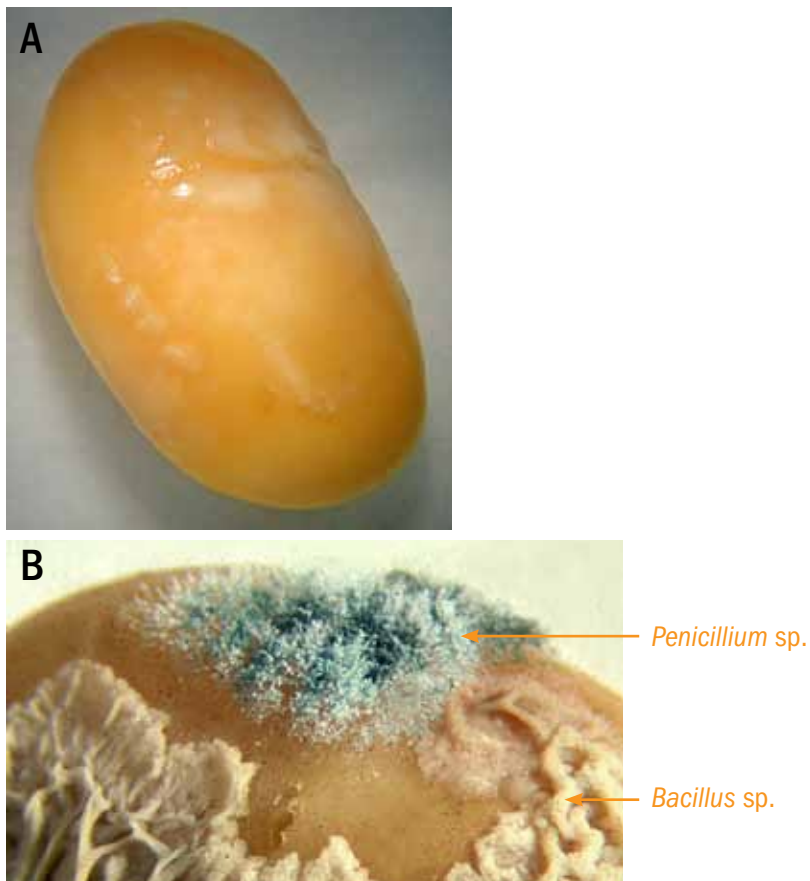


Figura 19. Bactéria. A) normalmente associada com semente morta e deteriorada; B) *Bacillus* sp. saprófita.

4.3. *Botryodiplodia* sp.

(Contaminante em soja, não é patogênico).

Foto: Agnes Izumi Nagashima

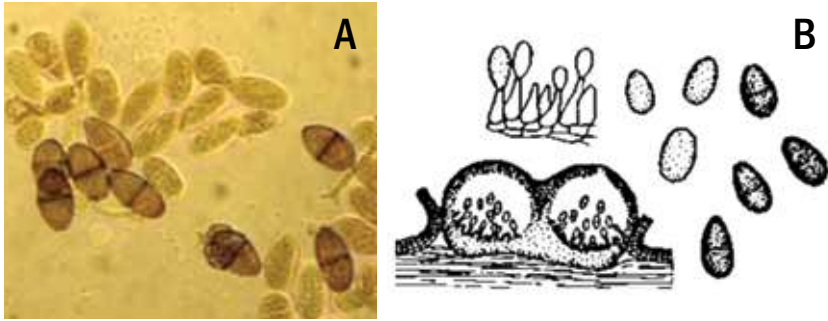


Figura 20. *Botryodiplodia* sp. A e B) Conídios novos (claros) e maduros (escuros), com parede dupla e septo transversal; B) picnídios e conídios.

Fonte: Barnett e Hunter (1972).

Fotos: Ademir Assis Henning

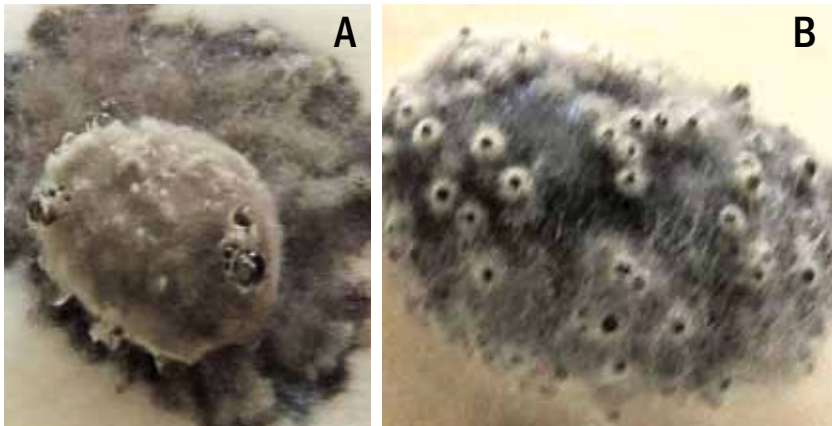


Figura 21. *Botryodiplodia* sp. A e B) Semente com *Botryodiplodia* sp.

4.4. *Chaetomium* sp.

Contaminante – cuidado para não confundir com *Colletotrichum*! Produz peritécios com cabeleira que pode ser confundida com as setas dos acérvulos de *C. truncatum*!

Fotos: Agnes Izumi Nagashima (A, B e D) e Ademir Assis Henning (E)

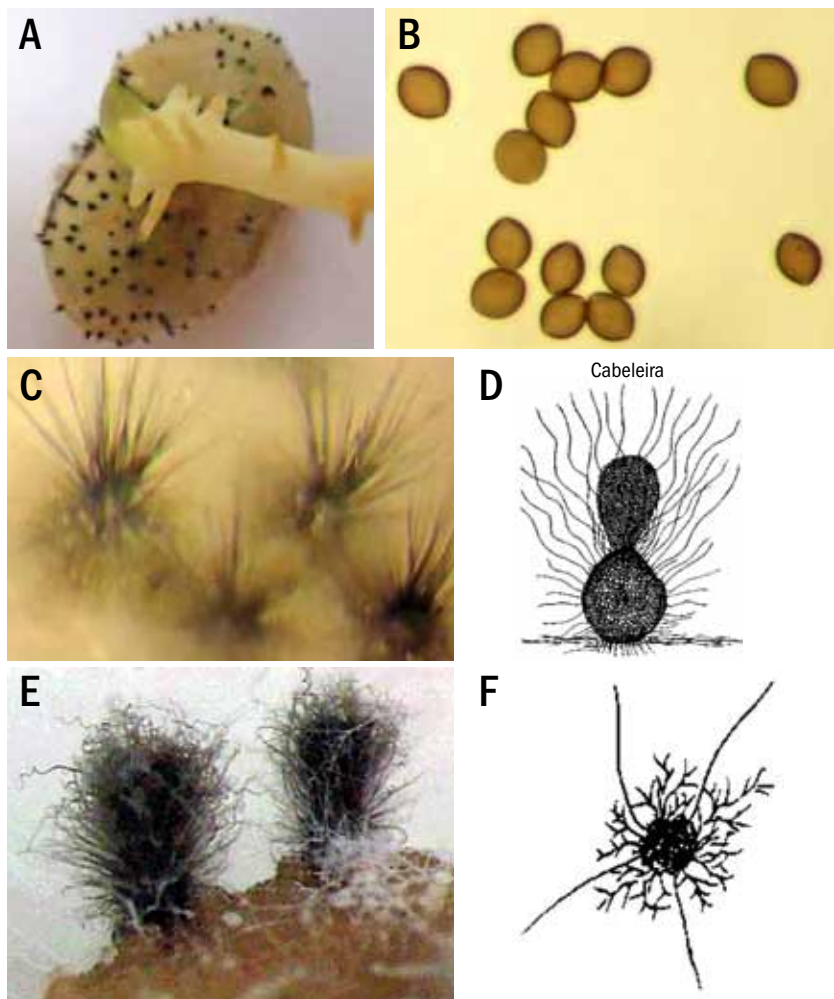


Figura 22. *Chaetomium* sp. A) Semente com *Chaetomium* sp.; B) ascósporos (esporos) em visualização por microscópio óptico (400 x); C, D, E e F) diferentes tipos de peritécios e cabeleiras.

Fonte: Henning et al. (2002).

4.5. *Cladosporium* spp.

Saprófita, contaminante.

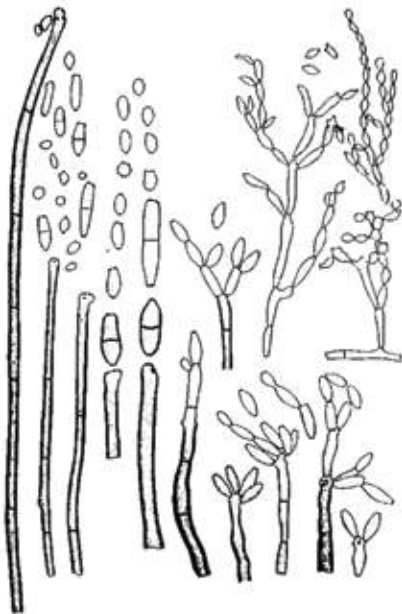


Figura 23. Conidióforos escuros e conídios de formas e tamanhos variados.

Fonte: Ellis (1976).

Fotos: Agnes Izumi Nagashima

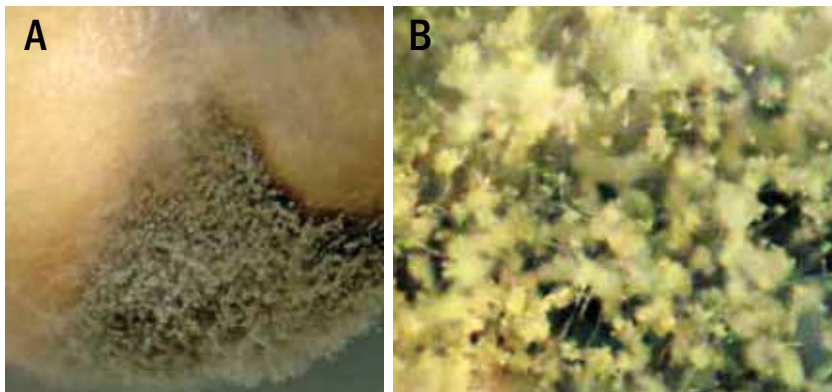


Figura 24. A e B) *Cladosporium* spp.

4.6. *Rhizopus* spp.

Saprófita, contaminante - produz rizóides o que o diferencia de *Mucor* sp.

Fotos: Ademir Assis Henning

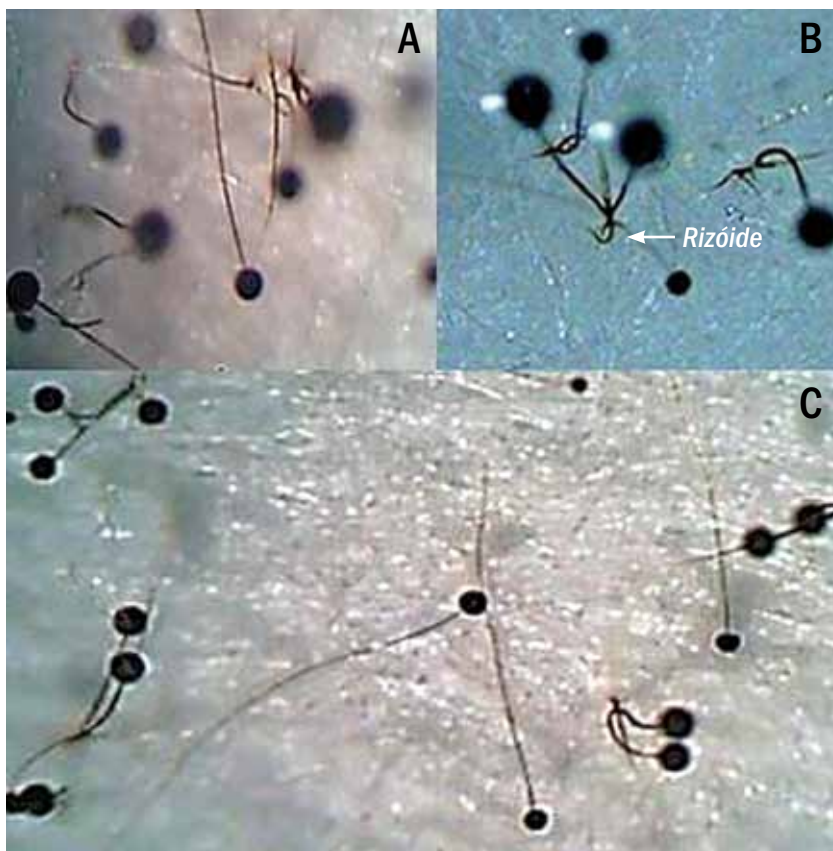


Figura 25. A, B e C) estrutura de *Rhizopus* spp. com rizóides em visualização por microscópio estereoscópico (50x).

Fotos: Agnes Izumi Nagashima

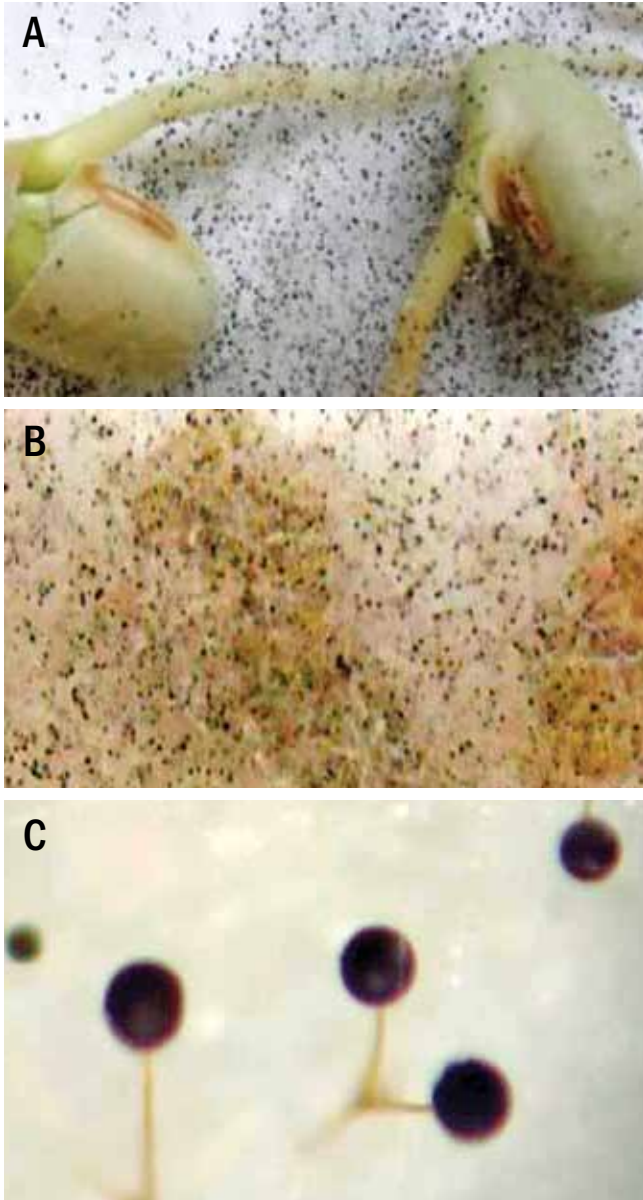


Figura 26. A e B) fungo contaminante espalhado em sementes e no papel de fitro; C - estrutura de *Rhizopus* spp. em visualização por microscópio óptico (400 x).

4.7. *Trichoderma* spp.

Contaminante, algumas espécies são utilizadas no controle biológico de patógenos importantes.

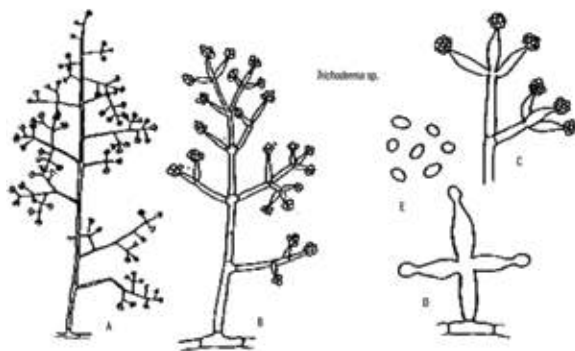


Figura 27. *Trichoderma* spp. A, B, C e D) Conidióforos hialinos muito ramificados; E) conídios pequenos elípticos
Fonte: Barnett e Hunter (1972).

Fotos: Agnes Izumi Nagashima

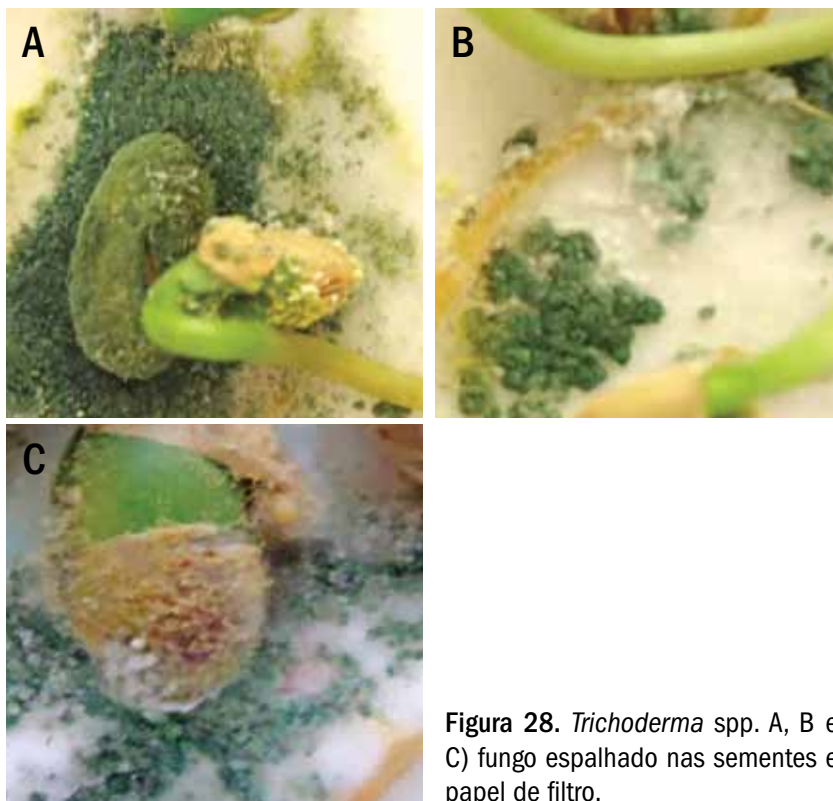


Figura 28. *Trichoderma* spp. A, B e C) fungo espalhado nas sementes e papel de filtro.

Referências

BOOTH, C. **The genus *Fusarium***. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 237 p.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3rd ed. Minneapolis: Burgess, 1972. 241 p.

ELLIS, M. B. **More dematiaceous hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1976. 507 p.

HENNING, A. A. **Patologia e tratamento de sementes: noções gerais**. 2. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 52 p. (Embrapa Soja. Documentos, 264).

HENNING, A. A.; MELCHIADES, A. R.; MORAES, S. R. **Patologia de sementes: ilustração das estruturas dos principais fungos em soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2002. 35 p. (Embrapa Soja. Documentos, 190).


REGRAS para análise de sementes. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009. 395 p.

SILVEIRA, V. D. **Lições de micologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: José Olimpio, 1968. 301 p.

SINCLAIR, J. B.; SHURTLEFF, M. C. **Compendium of soybean diseases**. Minnesota: The American Phytopathological Society, 1975. 69 p.

ANEXO

FICHA PARA AVALIAÇÃO DE ANÁLISE SANITÁRIA

		PATOLOGIA DE SEMENTES									
			REGISTRO N° _____								
MÉTODO: <input type="checkbox"/> PAPEL DE FILTRO <input type="checkbox"/>	PERÍODO: INÍCIO _____	TÉRMINO _____	N° SEM. TESTADAS _____								
ESPÉCIE <input type="checkbox"/> SOJA VARIEDADE <input type="checkbox"/>	DATA DA COLHEITA, MÊS E ANO: _____										
LOCAL DA COLHEITA: _____	DATA DO RECEBIMENTO: _____										
REMETENTE: _____											
PATÓGENOS (FUNGOS)	REPETIÇÕES:										%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
<i>Aspergillus flavus</i>											
<i>Aspergillus</i> spp.											
<i>Cercospora kikuchii</i>											
<i>Colletotrichum truncatum</i>											
<i>Fusarium pallidoroseum</i> (semitectum)											
<i>Fusarium</i> spp.											
<i>Macrophomina phaseolina</i>											
<i>Phomopsis sojae</i>											
(Outras determinações)											
BACTÉRIA											
SEMENTE DURA											
DANO											
GERMINADAS											
SAPRÓFITAS: <input type="checkbox"/> <i>Alternaria</i> sp.	<input type="checkbox"/> <i>Cladosporium</i> sp.	<input type="checkbox"/> <i>Mucor</i> sp.	<input type="checkbox"/> <i>Rhizopus</i> sp.								
<input type="checkbox"/> <i>Botryodiplodia</i> sp.	<input type="checkbox"/> <i>Curvularia</i> sp.	<input type="checkbox"/> <i>Nigrospora</i> sp.	<input type="checkbox"/> <i>Trichoderma</i> sp.								
<input type="checkbox"/> <i>Chaetomium</i> sp.	<input type="checkbox"/> <i>Helminthosporium</i> sp.	<input type="checkbox"/> <i>Penicillium</i> spp.	<input type="checkbox"/>								
OBSERVAÇÕES:											
											_____ ANALISTA

Embrapa

Soja

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PÁTRIA EDUCADORA



CGPE 11990