



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA

RESISTÊNCIA DA SOJA (*GLYCINE MAX* (L.) MERR.)
A *CYLINDROCLADIUM CLAVATUM* HODGES & MAY.

MARISA A. S. VELLOSO FERREIRA

Tese apresentada ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Fitopatologia.

BRASÍLIA - DF

1989

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA

RESISTÊNCIA DA SOJA [*GLYCINE MAX* (L.) MERR.]
A *CYLINDROCLADIUM CLAVATUM* HODGES & MAY.

MARISA A. S. VELLOSO FERREIRA

Tese apresentada ao Departamento de
Fitopatologia da Universidade de
Brasília, como requisito parcial
à obtenção do Grau de Mestre em
Ciências, na área de Fitopatologia.

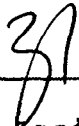
Brasília, - DF. 1989

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do professor José Carmine Dianese, com apoio institucional e bolsas da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Aprovado por:



Prof. José Carmine Dianese
Orientador



Prof. Francisco José Becker Reifschneider



Prof. Cláudio Lúcio Costa

Ao meu filho Victor,
meu marido Leandro,
meus pais e irmãos,
dedico.

AGRADECIMENTOS

- Ao professor José Carmine Dianese pela orientação, incentivo e apoio.
- Ao professor Francisco José B. Reifschneider pelas sugestões e correção do trabalho.
- Ao professor Cláudio Lúcio Costa pelas correções e ajuda nas análises estatísticas.
- Ao demais professores do curso de Mestrado em Fitopatologia pelos ensinamentos.
- À Dra. Maria Magaly V. S. Wetzel, do CENARGEN - EMBRAPA, pela colaboração e apoio durante o desenvolvimento do trabalho.
- Aos Drs. Jairo Silva e Clara Oliveira Goedert pela oportunidade e autorização para realizar parte dos experimentos no laboratório de Patologia de Sementes do CENARGEN.
- Aos Drs. João Luiz Gilioli (FT - Pesquisa e Sementes), Plínio Itamar de Souza (CPAC - EMBRAPA) e ao Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSO - EMBRAPA) pelas sementes fornecidas.
- Ao professor Juvenil E. Cares e a Nestor B. Lima pelos trabalhos fotográficos.
- À Patrícia de Sá pela elaboração do Summary.
- À Marta Gomes R. Faiad, Luiza Elizabeth Piauilino e todos os funcionários do CENARGEN, pela atenção e apoio.

- Aos funcionários e colegas do Laboratório de Fitopatologia da Universidade de Brasília, em especial à Mariza Sanchez, Simoni Campos Dias e Maria do Carmo Dristig, pela amizade e ajuda.
- À Leandro J. A. Irigonhê, pelos trabalhos de digitação da tese.
- Ao CNPq e à CAPES, pela concessão de bolsa de estudos.

ÍNDICE

	página
Apresentação.....	i
Dedicatória.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Índice.....	v
Lista de Tabelas.....	vi
Lista de Figuras.....	xi
Introdução.....	1
Material e Métodos.....	10
Resultados e Discussão.....	30
Resumo.....	78
Summary.....	80
Literatura Citada.....	82

LISTA DE TABELAS.

	Página.
Tabela 1 - Origem dos isolados de <i>Cylindrocladium clavatum</i> utilizados no estudo de virulência.	21
Tabela 2 - Índice médio de doença (ID) de plântulas de soja cv. Cristalina inoculadas com <i>Cylindrocladium clavatum</i> (ATCC 60587) em diferentes concentrações de inóculo e diferentes temperaturas, medidos seis dias após inoculação.	31
Tabela 3 - Índice médio de doença (ID) de plântulas da cultivar Cristalina após seis dias da inoculação com <i>Cylindrocladium clavatum</i> (ATCC 60587) através de dois diferentes métodos em concentrações crescentes de inóculo.	33
Tabela 4 - Índice médio de doença de plântulas da cultivar Cristalina submetidas a quatro diferentes métodos de inoculação de <i>Cylindrocladium clavatum</i> (ATCC 60587), em condições de casa de vegetação.	35

- Tabela 5 - Índice médio de doença (ID) de cultivares, linhagens e introduções de soja após 6 dias da inoculação com *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587) na concentração de 4×10^4 conídios/ml. 37
- Tabela 6 - Índice médio de doença (ID) de plântulas das cultivares Cristalina e FT-20, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587) em concentrações crescentes. 43
- Tabela 7 - Índice médio de doença (ID) de cultivares de soja após inoculação de *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587) em condições de casa de vegetação. 44
- Tabela 8 - Proporção do peso seco (g) das raízes de diferentes cultivares de soja em relação às suas testemunhas após inoculação de *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587) em condições de casa de vegetação. 46
- Tabela 9 - Porcentagem de produção de diferentes cultivares de soja após inoculação de *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587) em solo fumigado e natural. 49

- Tabela 10 - Porcentagem do peso de 100 sementes de diferentes cultivares de soja após a inoculação de *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587) em relação às suas testemunhas, em solo fumigado e solo natural. 51
- Tabela 11 - Frequência de colônias de *Cylindrocladium clavatum* isoladas de fragmentos de 1 cm de raízes secundárias de quatro cultivares de soja, submetidas a diferentes tratamentos de solo. 53
- Tabela 12 - Número de microesclerócios de *Cylindrocladium clavatum* recuperados por grama de solo, 4 meses após aplicação de diferentes tratamentos ao solo. 54
- Tabela 13 - Frequência e porcentagem de conídios por classes de comprimento e largura de *Cylindrocladium clavatum*. 57
- Tabela 14 - Frequência e porcentagem de vesículas por classes de comprimento e largura de *Cylindrocladium clavatum*. 58
- Tabela 15 - Crescimento micelial e produção de conídios de treze isolados de *Cylindrocladium clavatum* em meio de malte-levedura-agar. 60

- Tabela 16 - Patogenicidade de um isolado de *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587) de soja em diferentes espécies de leguminosas em casa de vegetação. 62
- Tabela 17 - Índice médio de doença (ID) de plântulas de cultivares de soja inoculadas com diferentes isolados de *Cylindrocladium clavatum*. 64
- Tabela 18 - Índice médio de doença (ID) de plântulas das cultivares Cristalina e FT-20 após inoculação de *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587) no hipocótilo. 66
- Tabela 19 - Índice médio de doença (ID) de plântulas de diferentes genótipos de soja após inoculação de *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587) no hipocótilo. 68
- Tabela 20 - Diâmetro médio (mm) das lesões produzidas em folhas destacadas das cultivares Cristalina e FT - 20 após inoculação de *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587) em diferentes concentrações. 71

Tabela 21 - Diâmetro médio das lesões (mm) produzidas em folhas destacadas de diferentes genótipos de soja após inoculação de *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587).

73

Tabela 22 - Coeficientes de correlação de Spearman entre índice médio de doença na raiz , índice médio de doença no hipocótilo e diâmetro médio da lesão na folha.

75

LISTA DE FIGURAS.

página.

- Figura 1 - Método para seleção de germoplasma de soja resistente a *Cylindrocladium clavatum*: (A) aspecto das raízes de plântulas da cv. Cristalina após 6 dias da inoculação por imersão em suspensão de conídios de *C. clavatum*; (B) lesões nas raízes secundárias e raiz principal; (C) controle; (D) lesões no colo e hipocótilo. 13
- Figura 2 - Escala de notas utilizada para avaliar severidade de sintomas de *Cylindrocladium clavatum* em raízes de soja, da esquerda para direita, de 0 a 4. 15
- Figura 3 - Método para inoculação de *Cylindrocladium clavatum* no hipocótilo de plântulas de soja. 26
- Figura 4 - Escala de notas utilizada para avaliação de severidade de sintomas de *Cylindrocladium clavatum* no hipocótilo, da esquerda para a direita, de 0 a 4. 27
- Figura 5 - Distribuição de genótipos de soja

agrupados em 4 classes distintas quanto à resistência a *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587), a saber: resistente (1), intermediária-resistente (2), intermediária-suscetível (3) e suscetível (4); e seus respectivos índices de doença (ID).

41

Figura 6 - Aspecto das raízes de plantas da cv. Cristalina após 25 dias da inoculação de *Cylindrocladium clavatum* em solo natural (esquerda) e em solo autoclavado (direita).

47

Figura 7 - Raízes de plantas das cultivares FT - 20 (esquerda) e Cristalina (direita) após 25 dias da inoculação de *Cylindrocladium clavatum* em solo autoclavado.

48

Figura 8 - Lesões de *Cylindrocladium clavatum* no hipocótilo de plântulas das cultivares Cristalina, Savana, FT - 20, IAC - 2 e PI 398733 após 5 dias da inoculação.

69

Figura 9 - Lesões de *Cylindrocladium clavatum* em folhas de soja em meio de agar-água com cinetina: controle (esquerda) e folha inoculada (direita) de (A) cv. Cristalina, (B) FT 812559, (C) Harosoy, (D) PI 398733, (E) FT - 20 e (F) Beeson.

INTRODUÇÃO

Botanicamente a soja pertence à família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, gênero *Glycine* L. que compreende cerca de 15 espécies sendo classificada como *Glycine max* (L.) Merrill (MIYASAKA, 1982).

Nos últimos vinte anos houve um aumento significativo na produção mundial de soja. Os Estados Unidos, que lideram a produção e exportação, tiveram no período de 1970 a 1980 uma participação média de 61% no volume mundial de produção (MIYASAKA, 1982). A partir de 1968/1969 o Brasil passou a ter produção significativa de soja. Já em 1976 assumiu o segundo posto entre os países produtores, com safra de 11.227.000 toneladas, correspondente a cerca de 18,9% da produção mundial naquele ano (CNPSO, 1987). As produções estimadas para 1987 e 1988 foram de 16.978.832 e 18.060.002 toneladas, respectivamente (AGROANALISYS, 1988). Inicialmente a cultura restringia-se ao Rio Grande do Sul, expandindo-se para outros estados em níveis significativos a partir de 1968 (MIYASAKA, 1982). Em função dos incentivos governamentais, bons preços e uso de tecnologia, agricultores do sul deslocaram-se para Goiás, Minas Gerais, Bahia e Mato Grosso, e iniciaram o cultivo da soja nos cerrados, apesar da baixa fertilidade dos solos e distribuição irregular das chuvas. Neste contexto, em 1976, foi recomendada para os cerrados a cultivar FT-Cristalina, o que representou um marco no desenvolvimento e expansão da cultura na região (GILIOLI et al. 1988). A produção comercial de soja no Distrito Federal (D.F.)

teve início na safra de 1973/1974, quando foram colhidos 13 hectares. Aumentos significativos tanto na produção quanto em área cultivada, contudo, só foram observados a partir de 1979. Entre 1980 e 1985 a porcentagem de participação do D.F. na produção nacional aumentou significativamente de 0,09 para 0,5% (CNPSO, 1987). O aumento da área cultivada de soja tende a proporcionar uma maior disseminação e um gradual aumento na severidade das doenças, além do aparecimento de novas doenças introduzidas pelo trânsito de sementes (FERREIRA et al. 1979). Mais de cem patógenos afetam a soja; cerca de trinta e cinco são mundialmente de importância econômica. Todas as partes da planta são suscetíveis a um número de patógenos que reduzem a qualidade e quantidade dos grãos. A extensão das perdas dependerá do patógeno, estado de desenvolvimento da planta quando ocorre a infecção, severidade da doença em plantas individuais e número de plantas infectadas (SINCLAIR, 1982).

Dentre as doenças das folhas e hastes da soja no Brasil, destacam-se: mancha olho-de-rã causada por *Cercospora sojina* Hara, mildio (*Peronospora manshurica* (Naoum.) Syd. ex Gaum.), septoriose (*Septoria glycines* Hemmi), antracnose (*Colletotrichum dematium* var. *truncata* (Schw.) Andrus & Moore), seca das hastes e vagens (*Phomopsis sojæ* Lehman), podridão branca da haste (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary), crestamento bacteriano (*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Coerper) Young, Dye & Wilkie), pústula bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye.), mosaico comum (vírus do mosaico comum da soja) e a queima do broto, causada pelo vírus da necrose branca

do fumo. As doenças das raízes já constatadas no Brasil são: tombamento e morte em reboleiras causados por *Rhizoctonia solani* Kühn, podridão de *Macrophomina* (*M. phaseolina* (Tassi) Goid), podridão de *Rosellina* (*R. necatrix* Prill. e *R. bunodes* (Berk & Br.) Sacc.) e galhas produzidas por *Meloidogyne* Goeldi spp. (CARDOSO, 1980; YORINORI, 1982).

Entre 1981 e 1982, observou-se pela primeira vez em plantios de soja do Distrito Federal, a ocorrência de áreas com plantas de crescimento desuniforme dando aspecto ondulado aos campos. No ano seguinte apareceram algumas reboleiras com plantas mostrando podridão escura na raiz principal e no colo, além da redução do volume de raízes secundárias e terciárias. De plantas doentes foram isolados: *Cylindrocladium clavatum* Hodges & May, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* Schlecht., *F. solani* (Mart.) Snyd. & Hans. e *Neocosmospora* E. F. Smith spp. Inoculações artificiais de *C. clavatum*, *Neocosmospora* spp e *R. solani* na cultivar Cristalina, em condições de casa de vegetação, revelaram maior patogenicidade de *C. clavatum* com índices de doença estatisticamente superiores aos demais (DIANESE et al. 1984). Posteriormente os três patógenos foram inoculados separada e simultaneamente em plantas da cultivar Cristalina em casa de vegetação, misturando-se o inóculo ao solo dos vasos. O maior dano foi causado quando os três fungos estavam presentes. A podridão escura do colo e raiz aparentou ser típica da infecção de *C. clavatum* (DIANESE et al. 1986).

A espécie *C. clavatum* foi descrita no Brasil por HODGES & MAY em 1972 e estava associada a uma doença radicular em

Araucaria angustifolia (Bert) Kuntze, *Eucalyptus saligna* Smith e *Pinus* L. spp., nos estados do Paraná, Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo. Até recentemente sua distribuição geográfica restringia-se ao Brasil e a ilha Mauritius, onde foi relatada causando podridão em raízes de chá (PEERALLY, 1974). Nos últimos anos sua ocorrência foi relatada na Índia, associada ao tombamento em *Eucalyptus* L'Her. sp. (RATTAN et al. ,1983), e nos Estados Unidos, causando nanismo e morte de plântulas de alfafa (*Medicago sativa* L.) no Havai (OOKA & UCHIDA, 1982) e lesões em folhas de *Strelitzia reginae* Ait. e *Callistemon* R. Br. sp., hastes e raízes de *Araucaria heterophylla* (Salisb.) Franco e raízes de *Pinus clausa* (Chapm.) Vasey var. *immuginata* Ward na Florida (BARNARD et al. 1989).

Cylindrocladium clavatum caracteriza-se pela produção de fialosporos cilíndricos, unisseptados e hialinos e pela presença de uma hifa estéril (ou estipe) que se destaca do conidióforo, terminando em uma vesícula clavada. Os conidióforos ramificam-se dicotômica e tricotomicamente em duas a quatro séries, com as ramificações medindo de 10 a 25 u de comprimento. Os ramos terminam em grupos de duas a cinco fiálides, medindo 8 - 12 x 3,2 - 3,6 u. Os conídios medem 37,6 - 47,9 x 3,4 - 5,6 u e são ligeiramente mais largos na ponta. A estipe é hialina, septada, medindo 2,5 - 3,5 u de diâmetro e variando de 115 - 220 u em comprimento, medido a partir do ponto de junção com o conidióforo. A vesícula possui de zero a um septo, medindo 35 - 60 x 4 - 4,8 u. O fungo cresce e esporula em meio de extrato de malte, batata-dextrose-agar (BDA), meio de fubá, batata-cenoura-

agar e meio de V-8. Culturas em BDA produzem um pigmento marron-avermelhado, microesclerócios e clamidósporos. (HODGES & MAY, 1972). De acordo com MORAES (1980), o meio de aveia-agar induziu maior produção de conídios sob regime de luz contínua para um isolado de amendoim. O meio de malte-levedura-agar induziu maior esporulação tanto para *C. clavatum* quanto para *C. scoparium*, comparado a outros meios de cultura (BLUM, 1989). O crescimento radial e a germinação de conídios são favorecidos por temperaturas entre 25 e 28°C (BOLKAN et al. 1981). Os microesclerócios são importantes estruturas de sobrevivência para o patógeno e sua longevidade no solo é influenciada tanto pela umidade quanto pela temperatura. Em solo não autoclavado e livre de detritos vegetais, o fungo foi capaz de sobreviver por um período de 150 dias. A temperatura que mais favoreceu a sobrevivência dos microesclerócios no solo foi 25°C (ALMEIDA & BOLKAN, 1981a). *Cylindrocladium clavatum* e outras espécies do gênero podem ser facilmente isoladas de solo infestado através de iscas de folha de mamona (ALMEIDA et al. 1978) ou folha de azalea (LINDERMAN, 1972). Meios seletivos ou semi-seletivos também foram desenvolvidos permitindo avaliações quantitativas da população no solo (KRIGSVOLD & GRIFFIN, 1975; PHIPPS et al. 1976; ALMEIDA & BOLKAN, 1980).

Cylindrocladium clavatum possui amplo círculo de hospedeiras. Sua ocorrência foi associada à podridão das raízes, carpóforos e vagens do amendoim (*Arachys hypogaea* L.) (MORAES, 1980); manchas foliares em caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) (CARDOSO et al. 1980); olho pardo de tubérculos de batata

(*Solanum tuberosum* L.) (BOLKAN et al. 1980, LOPES & MENDONÇA, 1980); redução de crescimento em pimentão (*Capsicum annuum* L.) (BOLKAN et al., 1981); tombamento em *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden (ALMEIDA & BOLKAN 1981c); e *E. saligna* (HODGES & MAY, 1972, BOLKAN et al. 1981); podridão radicular em ervilha (*Pisum sativum* L.) (LOPES & REIFSCHNEIDER, 1982); podridão de raízes, murcha e morte de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (ALMEIDA et al. 1982); murcha e lesões foliares em cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) (FEITOSA et al. 1984); tombamento e morte de plântulas de algarobeira (*Prosopis juliflora* DC.) (CARVALHO et al. 1986); podridão de raízes em grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) (DIANESE et al. 1987); podridão de raízes em tremoço (*Lupinus* (Tourn.) L. spp.) (LOPES et al. 1988); tombamento e morte de mudas em *E. cloeziana* F. Muell. (ALFENAS et al., 1988), podridão de raízes e queima de plântulas em espécies do gênero *Vochysia* Juss., nativas na região dos cerrados (DIANESE et al. 1988) e podridão de estacas de roseira (ROBBS et al. 1989). *Cylindrocladium clavatum* também foi isolado em alta frequência das rizosferas de soja, *Citrus* L. spp., *Eucalyptus* spp., *Pinus* spp., mamoeiro (*Carica papaya* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.); das raízes de *Albizia* Durazz. spp., *Inga* Scop. spp. e *Acacia* (Tourn.) L. spp., bem como de solos virgens e cultivados em diversas áreas do Distrito Federal (BOLKAN et al. 1981; ALMEIDA & BOLKAN, 1981a).

Além da podridão radicular, *C. clavatum* causa também lesões locais e queima foliar quando inoculado em folhas de soja. Os sintomas foram produzidos tanto em folhas destacadas como também

em plantas em casa de vegetação (RIBEIRO & DIANESE, 1986). Infestações do solo induziram lesões em raízes de soja das cultivares Cristalina, Savana, EPB 504, UFV-1, Santa Rosa e Paraná, mesmo a baixas concentrações de inóculo, a partir de 10 conídios/ml (RIBEIRO & DIANESE, 1986). Não se tem conhecimento sobre o comportamento de outras cultivares quanto à doença.

Existem poucos estudos sobre medidas aplicáveis para o controle de *C. clavatum* no Brasil. LOPES & REIFSCHNEIDER (1982) enfatizam o uso de longas rotações de culturas como medida de controle do fungo, uma vez que este é patogênico a culturas em expansão nos cerrados como soja, batata e ervilha. ANDRADE et al. (1983) avaliaram o efeito de cinco fungicidas sobre o crescimento micelial e germinação de conídios "in vitro". Benomil e tiabendazol foram os mais eficientes no teste de inibição de crescimento micelial. Para inibição da germinação de conídios, captafol e zineb foram os melhores. ALFENAS et al. (1988) comprovaram a eficiência de benomil e tiram na inibição do crescimento micelial do fungo e no controle de tombamento de mudas de *E. cloeziana*.

O uso de cultivares resistentes ou tolerantes é a medida mais eficiente e econômica para o controle de doenças (SINCLAIR, 1982). Contudo, a localização eficiente de fontes de resistência a serem utilizadas em programas de melhoramento requer o conhecimento das condições adequadas e favoráveis ao desenvolvimento da doença (PHIPPS & BEUTE, 1977). A seleção para resistência pode ser feita mais eficiente e rapidamente através da inoculação artificial, onde as chances de escape são

reduzidas e as plantas podem ser inoculadas em um estágio bem precoce, tornando-se possível minimizar o tempo e a quantidade de trabalho envolvidos (GIESSEN & STEENBERGEN, 1957).

O desenvolvimento de sintomas necessários à quantificação da podridão de raízes da soja causada por *C. clavatum* em solo infectado artificialmente, requer de 15 a 30 dias em condições de casa de vegetação, tornando lento o processo de seleção (DIANESE et al. 1986; RIBEIRO & DIANESE, 1986). Técnicas que permitam identificar a resistência de plantas, sob condições controladas, com maior economia de espaço e tempo, são desejáveis e têm sido empregadas para avaliar a reação da soja a outros patógenos do solo (MADUEWESI & LOKWOOD, 1976; CARDOSO et al. 1978; LEATH & CARROLL, 1982).

Considerando-se a importância da cultura da soja para o Brasil, em especial para a região dos cerrados, e o potencial de perdas representado pelo ataque de *C. clavatum*, devido ao seu amplo círculo de hospedeiras e ocorrência endêmica no solo, tornaram-se objetivos deste trabalho: desenvolver e testar um método rápido e eficiente para detecção de resistência em plântulas, selecionar germoplasma resistente, correlacionar a reação das cultivares selecionadas para resistência na raiz com sua reação à inoculação no hipocótilo e folha, comparar os resultados obtidos em condições de laboratório àqueles obtidos em casa de vegetação, comparar o efeito do patógeno em solo fumigado e natural, sob condições de campo e, finalmente, avaliar a virulência, em soja, de isolados obtidos de diferentes hospedeiras e compará-los quanto à morfologia, crescimento e

produção de conídios em meio de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de Fitopatologia e na Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília e no Laboratório de Patologia de Sementes do Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN - EMBRAPA), durante o período de 1987 a 1988.

1 - Método para seleção de germoplasma de soja resistente a *Cylindrocladium clavatum*.

Com o objetivo de padronizar um método para seleção de germoplasma de soja resistente a *C. clavatum* foi utilizada uma modificação da técnica descrita por MENEZES & DIANESE (1988).

1.1 - Produção e preparo do inóculo.

Para crescimento e esporulação do fungo (isolado ATCC 60587) foram utilizados meio de malte-agar (20 g de extrato de malte, 20 g de agar, 1000 ml de água) e meio de malte-levedura-agar (MLA)(3,0 g de extrato de malte, 2,0 g de extrato de levedura, 0,5 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 g de agar em um litro de água).

Para aumentar o inóculo, as placas foram raspadas com alça

de metal e a massa de esporos e micélio transferida para novas placas, riscando-se toda a superfície do meio de cultura. O preparo do inóculo foi feito pela adição de 10 ml de água estéril às placas riscadas, após 5-7 dias de incubação a 24-26°C sob luz fluorescente contínua, coando-se a suspensão obtida em camada dupla de gaze esterilizada, para eliminar o micélio. A calibração da concentração desejada foi feita em hemacitômetro.

1.2 - Tratamento e pré-germinação das sementes.

Inicialmente as sementes da cultivar Cristalina foram pré-tratadas com solução de hipoclorito de sódio a 1% por 3 minutos, lavadas com água destilada esterilizada e equidistantemente distribuídas sobre duas folhas de papel marca Germitest (Deleo & Cia Ltda. Rua Gonçalves Dias 309, Porto Alegre - RS. 90060) de 37 x 28 cm, umedecidas com água destilada. Cobriu-se as sementes com mais uma folha do mesmo papel; em seguida, dobrou-se as folhas para formar um cilindro que foi colocado na posição vertical, em saco plástico, em germinador (Stults Scientific Engr. Corp. Springfield, Illinois) a 25°C por 5 dias.

1.3 - Inoculação e incubação em câmara úmida.

Plântulas sadias com a raiz principal medindo de 6 a 8 cm foram selecionadas para inoculação por imersão das raízes em suspensão de esporos por cerca de uma hora. Em seguida as plântulas foram transferidas para caixas de acrílico (37 x 31 x

18 cm) revestidas, no fundo, com uma folha de papel para germinação do tipo "Kimpak" (Seedburo Equipment Company 1022 w Jackson Blvd, Chicago, Illinois.) umedecida com aproximadamente 500 ml de água destilada. Colocou-se sobre a mesma uma grade de alumínio (35 x 30 x 1 cm) contendo orifícios de 5 mm de diâmetro em intervalos de 3 por 3,5 cm, coberta com uma folha de papel Germitest umedecida. Esta foi perfurada e as plântulas selecionadas foram transferidas para seus orifícios com a raiz principal atravessando a placa de alumínio para permanecer em contato com o papel Kimpak. As caixas foram cobertas com plástico transparente para permitir a iluminação e manutenção da umidade saturada e, em seguida, foram incubadas em câmara de crescimento modelo 1-35LLVL (Percival - MFGCo, Boone, Iowa), em diferentes temperaturas e fotoperíodo de 12 por 12 horas (Figura 1).

1.4 - Método de avaliação.

A avaliação foi feita após 6 dias da inoculação com base em uma escala de notas de zero a 4 onde zero corresponde a raízes sem lesões visíveis; 1 - raiz principal apresentando pontos necróticos de 1 - 5 mm, principalmente na região do colo; 2 - raiz principal com lesões escuras maiores, de 6 - 10 mm, que coalescem na região do colo, raízes secundárias sadias; 3 - lesões de 11 - 15 mm no colo e ao longo da raiz principal, raízes secundárias junto ao colo reduzidas e com lesões; 4 -

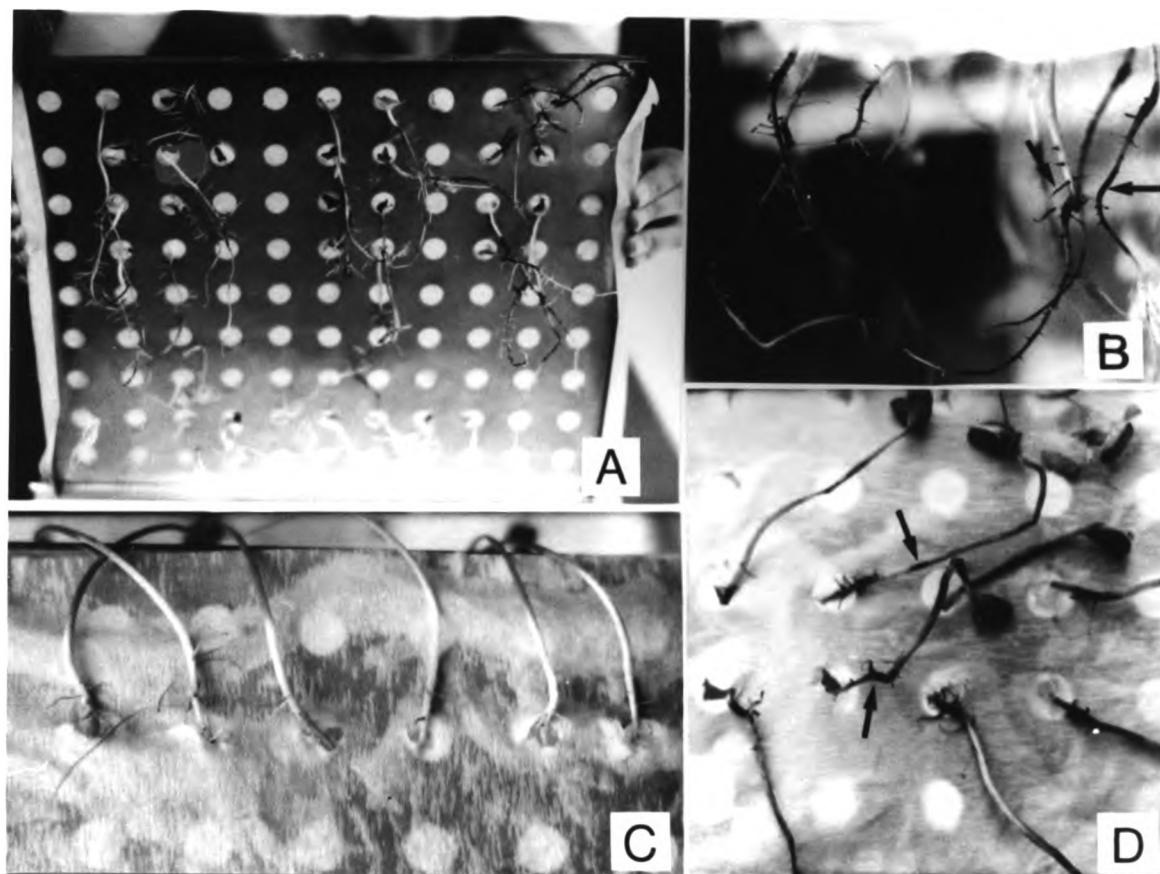


Figura 1 - Método para seleção de germoplasma de soja resistente a *Cylindrocladium clavatum*: (A) aspecto das raízes de plântulas da cv. Cristalina após 6 dias da inoculação por imersão em suspensão de conídios de *C. clavatum*; (B) lesões nas raízes secundárias e raiz principal; (C) controle; (D) lesões no colo e hipocótilo.

raiz principal apodrecida com lesões de comprimento superior a 15 mm, pouca ou nenhuma raiz secundária (Figura 2).

1.5 - Descrição dos experimentos.

1.5.1 - Efeito de temperatura e concentração de inóculo sobre a severidade dos sintomas.

Foram testadas temperaturas de 15, 20, 25 e 30°C e as concentrações de inóculo de 4×10^4 , 4×10^5 e 4×10^6 conídios/ml. O experimento foi instalado em parcelas subdivididas com cinco repetições compostas de três plântulas para cada tratamento, incluindo-se uma parcela testemunha onde as raízes das plântulas foram imersas em água esterilizada.

1.5.2 - Comparação entre métodos de inoculação em câmara de crescimento.

Para testar a eficiência do método de imersão usado, o mesmo foi comparado com a inoculação no colo de plântulas crescendo em copos de plástico contendo 200 ml de solo autoclavado (120°C por 1 hora). As plântulas selecionadas foram transplantadas para os copos e a inoculação foi feita, logo após o transplante, colocando-se 1 ml de suspensão de esporos junto ao colo, na linha do solo. Os copos foram incubados em câmara de crescimento à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Após 6 dias as plântulas foram retiradas e as raízes lavadas sob

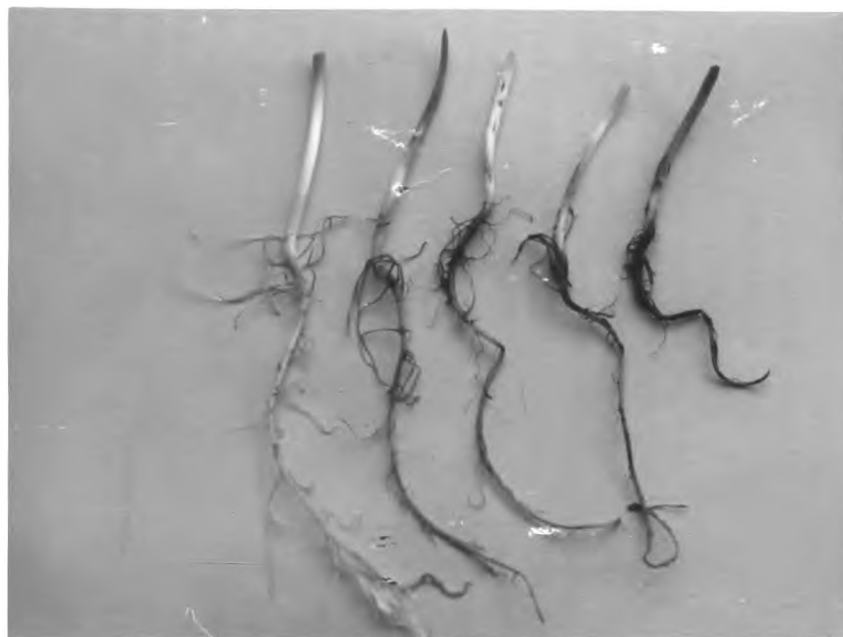


Figura 2 - Escala de notas utilizada para avaliar severidade de sintomas de *Cyindrocladium clavatum* em raízes de soja, da esquerda para direita, de 0 a 4.

água corrente e avaliadas segundo a escala de notas (Figura 2) . Foram testadas as seguintes concentrações de inóculo: 4×10^3 , 4×10^4 , 4×10^5 e 4×10^6 conídios/ml em um arranjo inteiramente casualizado com seis repetições, sendo a unidade experimental representada por um copo com duas plântulas. No tratamento testemunha as plântulas receberam 1 ml de água estéril junto ao colo.

1.5.3 - Comparação de métodos de inoculação em casa de vegetação.

Sob condições de casa de vegetação à temperatura de 18-31°C foram avaliados 4 métodos de inoculação. Utilizou-se o isolado UnB - 894 (ATCC 60587) e a cultivar Cristalina. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento, sendo a unidade experimental representada por dois vasos contendo três a quatro plantas cada um. Foram testados os seguintes métodos: 1) deposição de 2,0 ml de suspensão de esporos junto ao colo da plântula 6 dias após semeadura; 2) infestação prévia do solo com suspensão de conídios na proporção de 15 ml misturados a 500 g de solo seguida de semeadura; 3) pré germinação das sementes por 3 dias de acordo com o método descrito anteriormente, transplante para os vasos e inoculação com 2,0 ml de suspensão conidial junto ao colo; 4) pré- germinação das sementes seguida de imersão das raízes em 200 ml de suspensão de esporos durante uma hora e transplante para os vasos. Para todos os métodos a concentração

de inóculo empregada foi de $1-2 \times 10^6$ conídios/ml. A avaliação foi feita após 25 dias da inoculação retirando-se e lavando-se as raízes sob água corrente. Avaliou-se segundo a escala de notas já descrita.

2 - Seleção de germoplasma de soja resistente à *Cylindrocladium clavatum*.

Com a finalidade de testar e selecionar possíveis fontes de resistência foram avaliadas as cultivares recomendadas para plantio no Brasil para as safras de 86/87 e 87/88, linhagens usadas em programas de melhoramento e introduções (PI). As sementes dos materiais foram fornecidas pelo Banco Ativo de Germoplasma do Centro Nacional de Pesquisa da Soja (CNPSO), Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados (CPAC) e FT - Pesquisa e Sementes (convênio COOPA-DF-FT. BR 251, km 40 - Brasília - DF). As sementes de soja utilizadas no trabalho foram armazenadas em sacos de papel e conservadas a 10°C com 30% de umidade. Oito plântulas selecionadas de cada cultivar ou linhagem a ser testada foram inoculadas por imersão das raízes em 40 ml de suspensão de $4,0 \times 10^4$ conídios/ml de *C. clavatum* (ATCC 60587). As plântulas foram dispostas dentro das caixas em grupos de duas plântulas em um arranjo inteiramente casualizado. A incubação foi feita conforme método descrito anteriormente, em câmara úmida, a 25°C com fotoperíodo de 12 horas, por seis dias. Utilizou-se a cultivar Cristalina como

testemunha suscetível em todos os testes. A avaliação foi feita segundo a escala de notas da Figura 2.

Para verificar o desenvolvimento de sintomas em cultivares com diferentes níveis de suscetibilidade, plântulas da cultivar Cristalina (suscetível) e da cultivar FT-20 (resistente), obtidas após pré-germinação, foram inoculadas com o isolado UnB - 894 em 4 concentrações: $1,4 \times 10^3$, $1,4 \times 10^4$, $1,4 \times 10^5$, $1,4 \times 10^6$ conídios/ml. Incubou-se em câmara de crescimento a 25°C, sob condições de câmara úmida. As avaliações foram feitas 3, 6 e 9 dias após inoculação, com base em escala de notas. O delineamento estatístico utilizado foi o fatorial com quatro repetições compostas por duas plântulas para cada combinação de tratamentos.

Em condições de casa de vegetação, comparou-se os genótipos selecionados como possíveis fontes de resistência com a cultivar Cristalina. O delineamento experimental foi o fatorial inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo a unidade experimental representada por um vaso com quatro plantas. A reação dos genótipos foi observada em solo autoclavado e em solo natural, não autoclavado. A inoculação foi feita pelo método de imersão após pré-germinação das sementes por três dias, utilizando-se o isolado UnB - 894 e a concentração de $1,0 \times 10^6$ conídios/ml. Após 25 dias com temperatura variando de 18 a 31°C, as plantas foram retiradas e avaliadas quanto aos sintomas nas raízes pela escala de notas e, também, pelo peso seco do sistema radicular, após secagem em estufa a 65°C por 7 dias.

Sob condições de campo verificou-se a reação das cultivares

Savana, Cristalina, IAC-2 e FT-20 a *C. clavatum* em solo fumigado e natural, usando-se o arranjo de parcelas subdivididas (split-plot) com as cultivares dispostas em subparcelas de dez plantas com cinco repetições. Foram preparados quatro canteiros de 1,5 x 2,5 m, sendo que dois deles foram fumigados com brometo de metila (60 ml/m²), sob plástico preto selado por 48 horas. A adubação dos canteiros foi feita com 50 g/m² de NPK 0-30-15. As sementes foram inoculadas com *Rhizobium japonicum* Nitroar (Km 19 - BR 20 - Planaltina D.F. - CP 70008) na proporção de 1 kg de inoculante para 40 kg de sementes. Foi feita a pré-germinação das sementes por 3 dias, seguindo-se de transplante para sulcos feitos nos canteiros. Inoculou-se cada plântula pela deposição de 3 ml de inóculo (2×10^6 conídios/ml) junto ao colo, na linha do solo, 24 horas após o transplante. Para cada cultivar inoculou-se um canteiro fumigado e outro não fumigado. O espaçamento usado foi de 0,5 m entre linhas e uma população de 20 plantas por metro linear. Pesou-se a produção de grãos de cada cultivar ao final do respectivo ciclo, além de ter sido medido o peso de 100 sementes de cada parcela. Também foi avaliada a população de microesclerócios de *C. clavatum* nos quatro canteiros segundo método de KRIGSVOLD & GRIFFIN (1975). Este método consiste no peneiramento das amostras de solo de cada um dos canteiros em duas peneiras de malhas de 150 e 44 micrômetros, tratamento dos fragmentos orgânicos nelas retidos com NaOCl a 0,25% por 30 segundos e plaqueamento da suspensão obtida em meio seletivo (10 g de sacarose, 15 g de peptona, 1 g de KH₂PO₄, 0,5 g de MgSO₄.7H₂O, 0,5 g de oxgall, 2,3 mg de

tiabendazol, 50 ml de sulfato de estreptomicina, 200 ml de cloranfenicol, 75 mg de PCNB, 20 g de agar para 1 litro). As placas foram incubadas por 5 dias à temperatura ambiente (26°-28°C). Contou-se o número de colônias de *C. clavatum* que se desenvolveram nas placas, identificando-se o fungo pela morfologia e cor castanha da colônia e pelo exame ao microscópio, quando necessário.

O nível de infecção das raízes foi avaliado isolando-se o patógeno de 20% das plantas de cada cultivar, de cada canteiro. O isolamento foi feito em BDA contendo 300 ppm de cloranfenicol, após desinfecção superficial de segmentos de 1 cm das raízes secundárias com solução de NaOCl a 1% por 30 segundos. Para cada cultivar, e cada tipo de solo, preparou-se 10 placas com 10 segmentos de raízes cada uma.

3 - Virulência de isolados de *Cylindrocladium clavatum*.

3.1 - Origem e manutenção dos isolados.

Foram utilizados treze isolados de *C. clavatum* de diferentes hospedeiras (Tabela 1), todos procedentes do Distrito Federal com exceção dos isolados 970 e 971 de *E. urophylla* que são originários do estado do Pará. A manutenção a curto prazo - até 30 dias - foi feita em tubos de BDA através de repicagens periódicas e armazenamento a 18°C. Para a preservação a médio e

Tabela 1 - Origem dos isolados de *Cylindrocladium clavatum* utilizados no estudo de virulência.

Número do isolado	Origem
UnB - 894 (ATCC 60587)	soja (<i>Glycine max</i>)
UnB - 876	soja (<i>G. max</i>)
UnB - 970	eucalipto (<i>Eucalyptus urophylla</i>)
UnB - 971	eucalipto (<i>E. urophylla</i>)
UnB - 1087	grão-de-bico (<i>Cicer arietinum</i>)
UnB - 1092	tremoço (<i>Lupinus mutabilis</i>)
UnB - 1093	tremoço-branco (<i>L. albus</i>)
UnB - 1088	<i>Vochysia tucanorum</i>
UnB - 1090	<i>V. rufa</i>
UnB - 1127	<i>V. cinnamomea</i>
UnB - 1194	<i>V. elliptica</i>
UnB - 1311	batata (<i>Solanum tuberosum</i>)
CNPH - 142	ervilha (<i>Pisum sativum</i>)

a longo prazo utilizou-se o método de preservação em água destilada e esterilizada (FIGUEIREDO & PIMENTEL, 1975; DHINGRA e SINCLAIR, 1985).

3.2 - Caracterização dos isolados.

3.2.1 - Identificação das espécies.

A identificação dos isolados de *C. clavatum* foi feita com base em HODGES & MAY (1972) e PEERALLY (1974). Foram medidos cinquenta conídios e vinte clavas de cada isolado, após crescimento dos mesmos em MLA por sete dias sob luz fluorescente contínua, à temperatura de 22 - 26°C.

3.2.2 - Crescimento e produção de esporos em MLA.

Para verificar o crescimento radial em mm e a produção de conídios pelos treze isolados de *C. clavatum*, discos de 5 mm de diâmetro obtidos de culturas de 6-7 dias em MLA, foram inoculados em três placas por isolado, contendo o mesmo meio e mantidas sob luz fluorescente contínua à temperatura de 22 a 26°C. Aos seis dias foi medido o diâmetro das colônias em milímetros. Aos 14 dias retirou-se das placas 4 discos de 5 mm de diâmetro a partir de 2 cm do centro das mesmas. Os discos foram colocados em 5 ml de água esterilizada em um tubo. Agitou-se manualmente durante 30 segundos para liberação dos esporos e mediu-se a concentração em um hemacitômetro.

3.2.3 - Patogenicidade de um isolado de soja a diferentes espécies hospedeiras.

O isolado UnB - 894 (ATCC 60587) foi inoculado em outras leguminosas, em condições de casa de vegetação, à temperatura de 18 a 31°C. Foram testados: lentilha (*Lens culinaris* L.) cultivar Precoz, ervilha (*Pisum sativum* L.) cultivar Mikado, feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Carioquinha, tremoço-branco (*Lupinus albus* L.), uma variedade comercial de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) de semente branca e como testemunha, soja 'Cristalina'. Foram utilizadas caixas plásticas (48 x 30 x 10 cm) contendo solo esterilizado. Após semeadura e germinação, foram inoculados lotes de dez plantas de cada espécie, através de dois métodos. O primeiro consistiu na deposição de 2 ml de inóculo (3×10^6 conídios/ml) junto ao colo de cada plântula e, o segundo, na colocação junto ao colo, 1-2 cm abaixo da linha do solo, de discos de 15 mm de diâmetro de colônia esporulada em BDA e contendo microesclerócios. A idade das culturas foi de 7 dias. Após 15 dias as plântulas foram retiradas e observadas quanto à ocorrência de sintomas.

3.2.4 - Virulência de diferentes isolados de *C. clavatum* em genótipos de soja.

Treze isolados de *C. clavatum* (Tabela 1) foram inoculados nas cultivares Savana, Cristalina, Harosoy, IAC - 2, FT-20 e no

PI 398733. As plântulas foram inoculadas por imersão das raízes em suspensão de 10^5 conídios/ml, e incubação feita em câmara úmida a 25°C, conforme método já descrito no item 1. O delineamento estatístico usado foi o fatorial com três repetições compostas de duas plântulas para cada combinação genótipo/isolado. A avaliação foi feita após seis dias com base em escala de notas (Figura 2).

4 - Método de inoculação no hipocótilo para seleção de plântulas de soja resistentes a *Cylindrocladium clavatum*

Observou-se que *C. clavatum* causava também lesões de tamanho variável no hipocótilo de plântulas inoculadas. Utilizando-se uma modificação da técnica descrita por LAZAROVITS et al.(1980), testou-se o efeito de diferentes concentrações de inóculo nas cultivares FT-20 e Cristalina. Plântulas sadias obtidas após pré-germinação das sementes em rolo de papel a 25°C por 5-6 dias, foram colocadas na posição horizontal sobre uma folha de isopor medindo 34 x 25 cm sobre a qual foram postos dois suportes de isopor paralelos à maior largura e distantes um do outro 5 cm. Nestes suportes foram cortados vinte encaixes. As plântulas foram horizontalmente colocadas lado a lado, apoiadas nestes encaixes. A folha de isopor era então colocada dentro de uma câmara úmida de acrílico medindo 37 x 30 x 18 cm. As raízes das plântulas foram cobertas com uma folha de papel do tipo Kimpak, umedecido com água estéril. Foram feitos ferimentos superficiais no terço inferior do hipocótilo com a ponta de um

estilete e, em seguida, procedeu-se a inoculação por deposição de duas gotas de 5 microlitros de suspensão de esporos sobre o ferimento (Figura 3). Foi testado o isolado UnB - 894 nas concentrações de $1,6 \times 10^3$, $1,6 \times 10^4$, $1,6 \times 10^5$ e $1,6 \times 10^6$ conídios/ml, em quatro repetições de duas plântulas seguindo um arranjo inteiramente casualizado para cada combinação cultivar/concentração. As caixas foram cobertas com plástico transparente e incubadas a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. As avaliações foram feitas diariamente até o quinto dia da inoculação com uma escala de notas de zero a 4, onde zero indicava hipocótilo sem lesões visíveis; 1, hipocótilo com uma ou poucas lesões escuras e superficiais de 1 - 5 mm; 2, hipocótilo com lesões de 6 - 10 mm coalescendo e tomando até 25% do disco do hipocótilo; 3, hipocótilo com lesão escura de 11 - 15 mm de comprimento tomando de 25% a 50% da área do disco do hipocótilo e 4, lesão escura com comprimento superior a 16 mm tomando mais que 50% da área do disco, causando estrangulamento (Figura 4). Com o método estabelecido foram testados treze genótipos usando-se a concentração de $1-2 \times 10^4$ conídios/ml e avaliando-se no segundo e quinto dias após a inoculação. As plântulas usadas como testemunha foram tratadas apenas com gotas de água esterilizada e o delineamento estatístico usado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições.

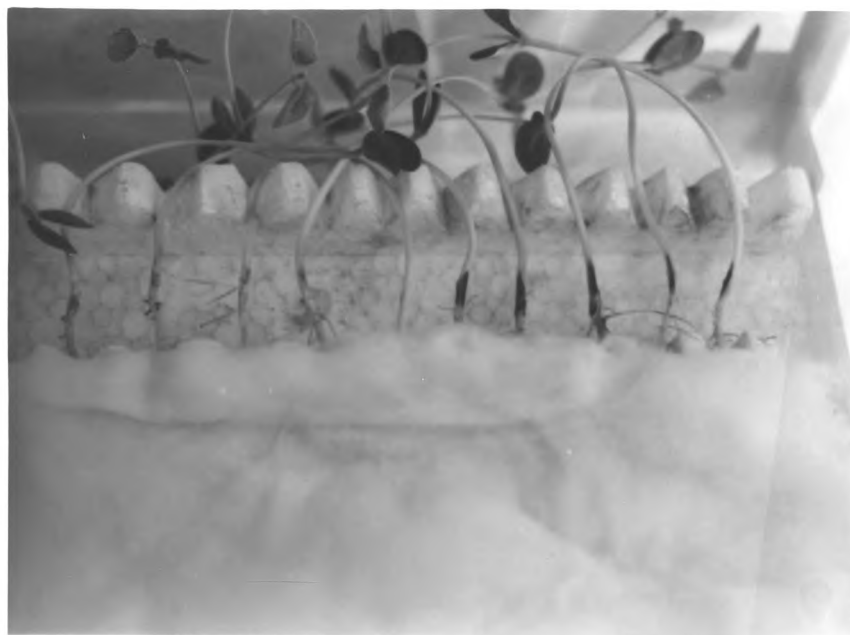


Figura 3 - Método para inoculação de *Cylindrocladium clavatum* no hipocótilo de plântulas de soja.



Figura 4 - Escala de notas utilizada para avaliação de severidade de sintomas de *Cylindrocladium clavatum* no hipocótilo, da esquerda para a direita, de 0 a 4.

5 - Inoculação foliar em cultivares resistentes e suscetíveis

Com o objetivo de verificar a possível correlação entre a resistência a *C. clavatum* na raiz e no tecido da folha, cultivares resistentes e suscetíveis foram comparadas. Utilizou-se o método empregado por BEEK et al. (1985), inoculando-se em folhas destacadas colocadas em meio de agar-água com cinetina (AAC) (6 g de agar, 0,1 ppm de cinetina por litro). Em todos os testes foi utilizado o isolado UnB - 894 nas concentrações de $1-2 \times 10^4$, 10^5 , 10^6 conídios/ml. As cultivares FT-20 e Cristalina foram semeadas em vasos em casa de vegetação e após 20-25 dias os folíolos da primeira folha trifoliolada foram destacados, tratados com solução de hipoclorito de sódio a 1%, secos em papel de filtro e colocados, um por placa, sobre meio de AAC. Em seguida preparou-se as suspensões de inóculo e depositou-se com micropipeta de 50 microlitros duas gotas de inóculo sobre cada folíolo. Incubou-se as placas em câmara de crescimento a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. Para cada tratamento foram utilizadas cinco repetições, seguindo um delineamento fatorial inteiramente casualizado. As avaliações foram feitas no segundo, quinto e sétimo dias após a inoculação, medindo-se com uma régua o diâmetro das lesões em mm. Treze cultivares de soja foram inoculadas usando-se este método e empregando-se a concentração de $1-2 \times 10^6$.

6 - Análises estatísticas

Para análise dos resultados foram aplicados testes não-paramétricos quando a avaliação era feita por escala de notas (SIEGEL, 1975). Utilizou-se a análise de Kruskal-Wallis, comparável à prova F paramétrica e à prova U de Mann-Whitney, para comparação de pares de médias. Quando não se utilizou escala de notas, foi empregada a análise de variância (teste F) e o teste de Tukey a 5% para comparação de médias (GOMES, 1982).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 - Método para seleção de germoplasma de soja resistente a *Cylindrocladium clavatum*.

1.1 - Efeito da temperatura e da concentração do inóculo.

Os sintomas de podridão nas raízes tornaram-se mais evidentes a partir de três dias após a inoculação, quando já se notavam lesões no colo das plântulas. Aos seis dias, época da avaliação, as plântulas mostravam além da podridão escura na raiz principal, lesões no hipocótilo e cotilédones. A partir da concentração de 4×10^5 conídios/ml notou-se também uma redução no crescimento das plântulas. Como pode ser observado na Tabela 2, o aumento na concentração do inóculo produziu um aumento significativo na severidade dos sintomas em todas as temperaturas testadas, exceto à 30°C. Pela análise de variância verificou-se que tanto o efeito da concentração quanto da temperatura foram significativos. A temperatura de 25°C diferiu de 15 e 20°C mas não houve diferença significativa de 30°C. Apenas quando se empregou a concentração 4×10^6 conídios/ml pode ser detectada diferença significativa entre as temperaturas de 25 e 30°C. De acordo com BOLKAN et al. (1981) a temperatura ótima para o crescimento micelial e germinação de conídios de *C. clavatum* está entre 25 e 28°C. A temperatura de 25°C foi também a que mais favoreceu a sobrevivência de microesclerócios no solo

Tabela 2 - Índice médio de doença¹ (ID) de plântulas de soja cv. Cristalina inoculadas com *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587) em diferentes concentrações de inóculo e diferentes temperaturas, medidos seis dias após inoculação.

Concentração do inóculo (conídios/ml)	ID			
	Temperatura (°C)			
	15	20	25	30
4 x 10 ⁴	1,3 a ² A ³	2,5 aB	2,8 aC	2,9 aC
4 x 10 ⁵	1,7 bA	2,9 bB	3,3 bC	3,3 aC
4 x 10 ⁶	2,3 cA	3,0 bB	3,7 cC	3,2 aB
Média	1,8 A	2,8 B	3,3 C	3,1 C

¹ Média das notas por 15 plântulas, baseada em escala de 0 a 4.

² Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pela prova U de Mann-Whitney (P<0,05).

³ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pela prova U de Mann-Whitney (P<0,05).

(ALMEIDA & BOLKAN, 1981 a). Temperaturas entre 24-28°C foram as mais adequadas para a produção de microesclerócios "in vitro" por outras cinco espécies de *Cylindrocladium* estudadas por HUNTER & BARNETT (1976). Além disso, à temperatura de 25°C (Tabela 2) houveram diferenças significativas entre as três concentrações de inóculo testadas. A concentração de 4×10^4 conídios/ml produziu um índice médio de 2,8 para a cv. Cristalina e mesmo nesta concentração não houve escape e as plântulas apresentaram sintomas típicos de podridão de raiz e do colo, não ocorrendo sintomas muito drásticos de redução de crescimento e morte de plântulas. Desta forma, considerou-se esta concentração, associada à temperatura de 25°C, como condições adequadas para seleção de germoplasma resistente, por não maximizar a doença e permitir também o reconhecimento de cultivares de reação intermediária.

1.2 - Comparação entre métodos de inoculação em câmara de crescimento e em casa de vegetação.

Em condições de câmara de crescimento, à temperatura de 25°C, o método de imersão das raízes mostrou-se mais eficiente que o método de inoculação no colo, produzindo índices de doenças superiores mesmo a baixas concentrações (Tabela 3). Em condições de casa de vegetação os sintomas desenvolveram-se mais lentamente e a avaliação foi feita após 25 dias da inoculação. O método de imersão das raízes em suspensão de esporos e posterior transplante para o solo esterilizado resultou em

Tabela 3 - Índice médio de doença¹ (ID) de plântulas da cultivar Cristalina após seis dias da inoculação com *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587) através de dois diferentes métodos em concentrações crescentes de inóculo.

Concentração de inóculo (conídios/ml)	ID	
	Método de Inoculação ²	
	Imersão	No colo
4 x 10 ³	1,6 a ³ A ⁴	0,6 a B
4 x 10 ⁴	2,7 b A	1,5 b B
4 x 10 ⁵	3,2 c A	2,3 c B
4 x 10 ⁶	3,3 c A	3,4 d A

¹ Média das notas de 12 plântulas baseada em escala de 0 a 4.

² Imersão - imersão das raízes em suspensão de esporos por 1 hora e posterior transplante para caixa de acrílico contendo papel "Kimpak" umidecido;

No colo - deposição de 1 ml de suspensão de esporos junto ao colo de plântulas crescendo em solo esterilizado.

³ Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pela prova U de Mann-Whitney (P<0,05).

⁴ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pela prova U de Mann-Whitney (P<0,05).

níveis superiores de doença do que os demais métodos testados (Tabela 4). O transplante das plântulas seguido de inoculação pela deposição de quantidade definida de inóculo junto ao colo, aparentemente não predispôs as raízes à infecção, pois este método não diferiu da inoculação no colo após semeadura direta no solo, sem o transplante. LOPES & REIFSCHNEIDER (1982) também utilizaram método de imersão das raízes em suspensão de esporos por 30 segundos para testar a patogenicidade de *C. clavatum* à ervilha. O método produziu um rápido desenvolvimento dos sintomas que podiam ser observados a partir de 4 dias após a inoculação. BITTENCOURT et al. (1985) testaram a patogenicidade de *Fusarium solani* à ervilha pela imersão das raízes em suspensão contendo 10^6 a 10^8 conídios/ml durante 3 minutos e posterior transplante para solo esterilizado. Embora muitos autores tenham utilizado a infestação artificial do solo (DIANESE et al., 1986; RIBEIRO & DIANESE, 1986; ALMEIDA & BOLKAN, 1981 c ; DATNOFF & SINCLAIR, 1988), o método de imersão das raízes geralmente dá resultados similares àquels obtidos infestando-se o solo, porém, os sintomas são mais severos e aparecem mais cedo, o que é bastante desejável em um programa de seleção onde é preciso testar grande número de genótipos em um curto espaço de tempo (DHINGRA & SINCLAIR, 1985). O método de imersão das raízes mostrou-se eficiente, tanto em condições de câmara de crescimento quanto em casa de vegetação, para a produção de sintomas da infecção de *C. clavatum* em raízes de soja. A uniformidade, ausência de escape e maior severidade de doença são as principais vantagens do método e são também

Tabela 4 - Índice médio de doença de plântulas da cultivar Cristalina submetidas a quatro diferentes métodos de inoculação de *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587), em condições de casa de vegetação.

Método de Inoculação ¹	Índice médio de doença ²
Infestação do solo	1,5 a ³
No colo	2,3 b
Pré-germinação/colo	2,4 b
Pré-germinação/imersão	3,3 c

¹ Infestação do solo - adição de 15 ml de suspensão de esporos à 500 g de solo esterilizado;

No colo - deposição de 2 ml de suspensão de esporos junto ao colo das plântulas após 7 dias da sementeira;

Pré-germinação/colo - pré-germinação das sementes em papel Germitest a 25°C por 3 dias, transplante para solo e deposição de 2 ml de suspensão de esporos junto ao colo;

Pré-germinação/imersão - pré-germinação como no método anterior, imersão das raízes em suspensão de esporos por 1 hora e transplante para solo esterilizado.

² Média das notas de 5 repetições, baseada em escala de 0 a 4.

³ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pela prova U de Mann-Whitney.

características muito úteis em um processo de seleção de fontes de resistência. A principal desvantagem, porém, é que devido a maior severidade de doença produzida, genótipos com resistência intermediária não são detectados.

2 - Seleção de germoplasma de soja resistente a *Cylindrocladium clavatum*.

Foram avaliadas 457 genótipos de soja, entre cultivares, linhagens e introduções (PI), em condições de câmara de crescimento. Os índices de doença, ou seja, a média das notas, em escala de 0 a 4, variaram de 1,0 a 3,6, mostrando a existência de variabilidade quanto à reação ao patógeno (Tabela 5). Utilizando a técnica estatística de grupamentos ou "clusters", a variável nota foi usada para criar uma medida de distância entre os genótipos, agrupando-os de acordo com suas semelhanças ou menores distâncias em quatro classes (Figura 5). A classe 1, considerada resistente, foi constituída por sete genótipos: FT 81-2559, FT - 20, IAC - 2, Harosoy, Beeson, Dare e PI 398733, que apresentaram índices de doença inferiores a 1,5. Aproximadamente 94% do material testado foi agrupado nas duas classes intermediárias; apenas 21 foram altamente suscetíveis com índices superiores a 3,0.

Não houve relação entre duração do ciclo das cultivares e resistência ao fungo, pois cultivares precoces como FT - 20 e outras tardias como IAC - 2 mostraram-se resistentes. Também não se observou relação entre resistência e cor do tegumento da

Tabela 5 - Índice médio de doença¹ (ID) de cultivares, linhagens e introduções de soja após 6 dias da inoculação com *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587) na concentração de 4×10^4 conídios/ml.

Genótipo	ID
Dare, FT 81-2559, PI 398733	1,0
FT-20 (Jaú)	1,1
Beeson, IAC-2	1,3
Harosoy	1,4
BR 81-6815, D 64-4485, FT 80-30038, FT 80-4280, FT 82-44968, Hutton, OCEPAR 8, PI 171451, PI 230973, PI 3400218, PI 374168, PI 374186, PI 416810, PI 424616, Swift, S-100, T 104, T 176, T 255, UFV/ITM 1	1,5
Ranson, BR 79-1540, BR 83-8977, PI 399126, São Gabriel, BR 82-5467, BR 83-1257, BR 84-4736, BR-5, PI 170899, PI 399053, PI 417386, Protana, R-61838, Semente Pequena	1,6
BR 83-5466, IAC-14, OCEPAR 6, PI 230971, PI 416828, PI 92743, Timbira, União, FT 80-25356, FT 84-43359, FT 84-66761, PI 374159	1,7
Abura, Amsoy, BR 80-20414, BR 84-4740, Buffalo, FT 80-25054, FT 81-1720, FT 82-4954, FT 84-45874, FT 84-65888, FT-18 (Xavante), GO 81-11174, IAC-4, PI 157487, PI 180151, PI 181556, PI 208434, PI 284816, PI 340899, PI 417422, Santa Rosa, T 201, T 223, T 229, T 252, Tracy, Wabash, Woodworth, Guavira (MSBR-18), IAS 5, FT-17 (Bandeirantes), IAC-7, J-200, PI 181567, PI 398580, Boone, BR 80-18917, Ceu Azul 1, D 66-10955, MG 84-392, PI 200505	1,8
FT-2, BR 79-31339, BR 80-14222, BR 80-6760, BR 80-6778, BR 84-7788, BR 85-10488, BR 85-3652, BR-27, Clark 63, D 61-42698, F 83-9192, FT 80-25355, FT 80-25424, FT 80-32405, FT 80-50076, FT 82-65686, FT-5 (Formosa), IAC-Foscarin 31, Paraná, Paranagoiana,	

Tabela 5 (continuação)

Genótipo	ID
PI 205899, PI 376070, PI 381679, PI 381682, PI 398487, PI 82184 S, PI 86045 S, Prata do Norte, TGM 693, Tropical, UFV-9 (Sucupira), FT 80-25250, São Carlos, IAC-9, FT-14 (Piracema), Tiarajú	1,9
FT-7 (Tarobá), Arksoy, Austin, BR 79-32849, BR 79-6217, BR 82-1166, BR 82-1173 RC1, BR 83-1168, BR 84-270, BR 84-4735, BR 84-4739, BR 85-119, BR 85-19360, BR 85-3649, BR 85-3658, BR 85-3671, BR 85-8505, BR-1, BR-3, CEP-10, Crawford, Cutler 71, D 62-7802, D 64-4603, D72-7944, Década, EMGOPA 301, EMGOPA 303, Essex, FC 31721, FT 79-1506, FT 80-24063, FT 80-25283, FT 80-25284, FT 80-25298, FT 80-25363, FT 80-25500, FT 80-30026, FT 80-30029, FT 80-30145, FT 80-32403, FT 81-1866, FT 81-32537, FT 83-31240, FT 83-31900, FT 84-60743, FT 84-62429, FT 84-63787, FT 84-66162, FT-10 (Princesa), FT-19, FT-2T, FT-8 (Araucária), FT-9 (Inaê), Garimpo (MGBR 22), Gatan, GO 83-16067, GO 83-16069, GO 83-16097, GO 83-17041, GO BR 83-41004, GO BR 83-51007, GO BR 83-51012, Hardee, IAC-11, IAC-12, Ivaí, McCall, N 59-6825, N 60-5136, OCEPAR 4 Iguaçu, OCEPAR 5 Piquiri, Paranaíba, Pequi, PI 123440, PI 165524, PI 170889, PI 170891, PI 170895, PI 205915, PI 208430, PI 227687, PI 238928, PI 240665, PI 342002, São Luiz-1, Scott, Sertaneja, Shore, Sulina, T 153, Yelnanda	2,0
FT 80-30031, BR 82-4843, BR 83-6288, BR 83-8447, BR 84-122, BR 84-4716, BR 84-4729, BRAS 83-1582, CPAC 83-42, EMGOPA 302, FT 79-3637, FT 80-25402, FT 80-30146, FT 80-30736, FT 84-30026, FT 84-63219, FT-11 (Alvorada), FT-13 (Aliança), FT-16, GO 83-16629, GO BR 83-58035, GO BR 83-60040, Lincoln, Peking, PI 165947, PI 259542, PI 339866, PI 340009, PI 417084, PI 96035, Viçoja, MBS-1 (PUB. CINZA), Planalto, TGM 737	2,1
BR 83-6508, Biloxi, Cobb, IAS 3 Delta, Monetta, PI 285097, SEL 419, D 62-7803, IAC-8, BR 83-10422, EMGOPA 304, LO 75-10165, Mineira, PI 85490	2,2
BR 79-6276, BR 82-2198, BR 85-14823, BR 85-18207, BR 85-19468, BR 85-1962, BR-4, Doko, FT 80-25220, FT 80-4954, FT 83-30029, FT 84-64517, FT-15, FT-4,	

Tabela 5 (continuação)

Genótipo	ID
FT-Estrela, GO 83-15081, GO BR 85-62014, GO BR 85-63012, Invicta, IPAGRO-21, MG BR 84-326, Nova IAC-7, OCEPAR 9 SS1, Pérola, PI 171443, PI 239236, Portage, San Ming 73-11, UFV-7 (Juparanã), Coker 136, FT 84-6403, IAC-5, Aroyelles, IAS 4, PI 175185, Lancer, Sant'Ana, Bossier, Centennial, FT 80-25246, N 46-2652	2,3
BR 83-9312, BR 85-2288, CEP-12 (Cambará), CEP-16 (Timbó), FT 80-32401, FT-1, FT-12 (Nissei), FT-Seriema, GO 83-34012, Ivorá, PI 323563, PI 323566, PI 416961, PI 90251, PI 90495, Santa Rosa Marron 3, UFV-Araguaia, BR 84-6160, FT 80-25158, FT 84-66721, GO BR-26, GO BR-27, MG BR 84-352, PI 274508, PI 159923, BR 81-3195, FT 84-62876, JEW-45, MG 84-343	2,4
BR 80-15955, BR 83-5391, BR 84-4662, BR-12, BR-14 (Modelo), Cristalina, D 71-9241, D 71-9289, FC 30967, FT 84-61679, FT-Cometa, FT-Jatobá, GO 83-16639, GO BR 83-40025, GO BR 85-61028, Industrial, Júpiter, OCEPAR 2 Iapó, PI 166140, PI 210353, PI 60273, PI 84642, Steele, UFV-10 (Uberaba), UFV-5, Vila Rica, Williams	2,5
BR-2, FT 84-61784, FT 84-63014, GO 83-16010, D 69-8201, São Luiz, BR 84-4715, F 60-2464, FT 84-64512, GO 83-30063, GO 83-30068, GO 83-33011, GO BR 85-63005, IAC-6, PI 330635, Rillito, T 180	2,6
BR 84-4698, BR 84-4783, Majôs, BR-11, Campos Gerais, Davis, FT 84-45989, BRAS 83-2577, FT-3	2,7
BR 84-4752, Dourados, FT 80-25501, FT 84-45974, LC 72-749, PI 200 547, PI 417502, Rhosa PI 324924, Semmes, UFV-8 (Monte Rico), Andrews, PI 96089	2,8
BR-13 (Maravilha), BR-8 (Pelotas), HP 963, Kuradaizu, PI 171436, PI 228065, UFV-1	2,9
BR 85-20398, BR-10 (Terezina), CNS-4, Columbus, D 60-8922A, D 62-7814, FT 80-25381, FT 80-30143, FT-6 (Veneza), FT-Maracaju, Kent, Numbaira, PI 174852, PI 159319, PI 165675, PI 181566, PI 215693, PI 323580, PI 360851, PI 371607, PI 381671, PI 416787	3,0

Tabela 5 (continuação)

Genótipo	ID
BR-9 (Savana), D 70-8444, D 72-7852, Jackson, PI 171441, PI 200510, PI 381669, Tarheel Black, FT 84-65462, PI 210350	3,1
PI 200447	3,2
K 28-A, PI 170893, PI 340045	3,3
PI 230977	3,4
Bragg, D 72-7724, IPAGRO-20, OCEPAR 3-Primavera, PI 157440	3,5
D 548-43	3,6

¹ Média das notas de 8 plântulas baseada em escala de 0 a 4.

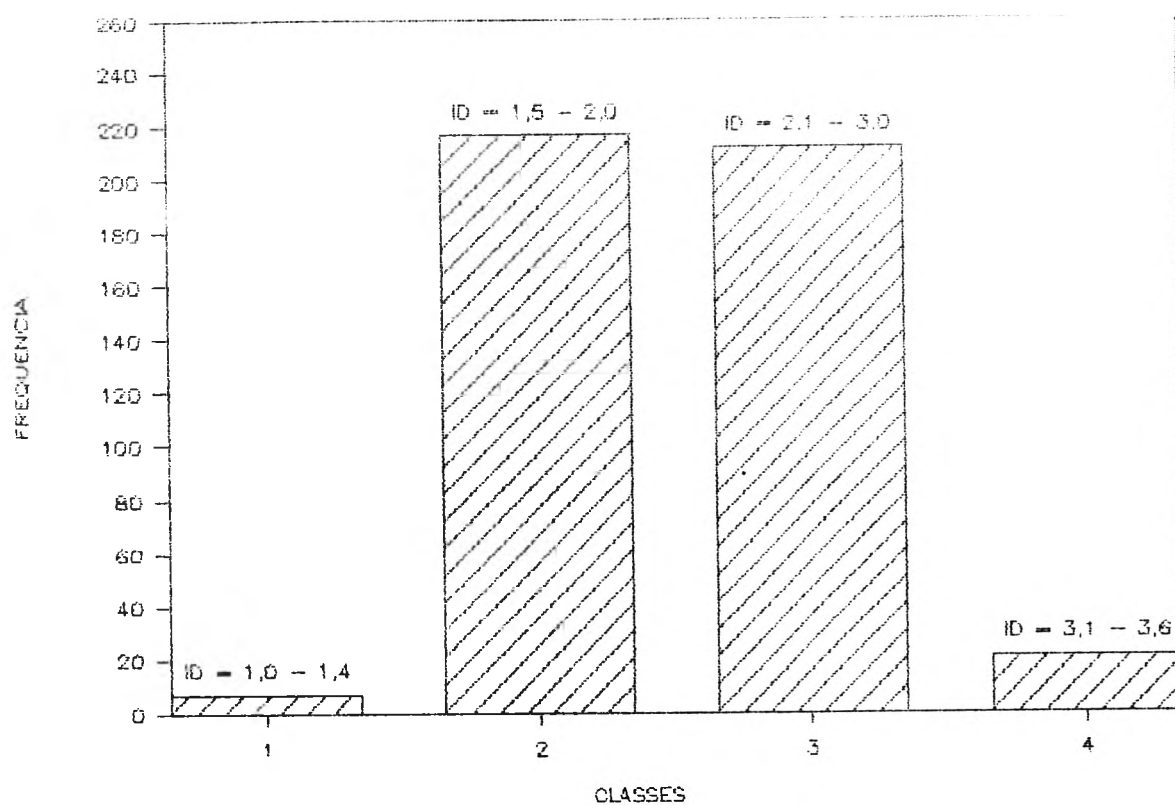


Figura 5 - Distribuição de genótipos de soja agrupados em 4 classes distintas quanto à resistência a *Cyliandrocladium clavatum* (ATCC 60587), a saber: resistente (1), intermediária-resistente (2), intermediária-suscetível (3) e suscetível (4); e seus respectivos índices de doença (ID).

semente. Muitos autores têm relacionado a resistência do feijão a *Rhizoctonia solani* à cor escura da semente (PRASAD & WEIGLE 1976, CARDOSO et al. 1978). A introdução PI 398733 apresenta sementes de tegumento preto, no entanto, as demais cultivares que apresentaram semelhante reação de resistência possuem sementes cujo tegumento é amarelo. A linhagem FT 81-2559 e a cultivar FT - 20, apesar de terem mostrado resistência, não possuem parentais comuns (GILIOLI, comunicação pessoal). Já Beeson e Dare apresentam um ancestral comum: Ogden. Sendo assim, seria interessante investigar mais detalhadamente a filogenia destes genótipos e testar a reação de seus ancestrais ao patógeno.

Em um segundo experimento testou-se o efeito de diferentes níveis de inóculo nas cultivares Cristalina e FT-20 (Tabela 6). Verificou-se que nas concentrações entre $1,4 \times 10^4$ e $1,4 \times 10^5$ conídios/ml não houve diferença significativa entre as médias das notas para a cv. FT-20 nas três épocas de avaliação. Mesmo aos três dias após a inoculação foi possível detectar diferenças entre os genótipos usando-se as concentrações de $1,4 \times 10^5$ e $1,4 \times 10^6$ conídios/ml. No sexto e nono dias, diferenças entre os genótipos foram significativas mesmo na concentração mais baixa ($1,4 \times 10^4$ conídios/ml).

Em um experimento posterior, em casa de vegetação, as cultivares pré-selecionadas como resistentes foram comparadas ao padrão de suscetibilidade 'Cristalina' tanto em solo autoclavado quanto em solo natural. A Tabela 7 mostra os índices de doença obtidos após avaliação por escala de notas. As diferenças entre

Tabela 6 - Índice médio de doença¹ (ID) de plântulas das cultivares Cristalina e FT-20, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587) em concentrações crescentes.

Concentração de inóculo (conídios/ml)	ID Dias após a inoculação					
	3		6		9	
	C ²	F ³	C	F	C	F
$1,4 \times 10^3$	0,9a ⁴ A ⁵	0aB	1,4aA	0,5aB	1,6aA	1,3aA
$1,4 \times 10^4$	1,5bA	1,4bA	2,4bA	1,6bB	2,9bA	2,0bB
$1,4 \times 10^5$	2,5cA	1,6bB	3,0cA	1,9bB	3,8cA	2,4bB
$1,4 \times 10^6$	3,9dA	2,3cB	4,0dA	3,5cB	4,0cA	3,5cB

¹ Média das notas de 8 plântulas baseada em escala de 0 a 4.

² Cristalina.

³ FT - 20.

⁴ Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pela prova U de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

⁵ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, para cada dia de avaliação, não diferem entre si pela prova U de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

Tabela 7 - Índice médio de doença¹ (ID) de cultivares de soja após inoculação de *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587) em condições de casa de vegetação.

Genótipo	ID	
	solo autoclavado	solo natural
Cristalina	2,9 a ² A ³	1,8 a B
Dare	2,3 a b A	1,4 a B
Beeson	1,9 b c A	1,4 a A
PI 398733	1,8 b c A	1,4 a B
IAC-2	1,5 c d A	1,3 a A
Harosoy	1,4 c d A	1,1 a A
FT-20	1,3 d A	0,6 b B
FT 81-2559	--	0,1 c
Média	1,9 A	1,1 B

¹ Média das notas (escala de 0 a 4) de 5 repetições.

² Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pela prova U de Mann-Whitney (P<0,05).

³ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pela prova U de Mann-Whitney (P<0,05).

cultivares e também entre os dois tipos de solo foram significativas como demonstrou a análise de variância.

Em solo autoclavado os índices de severidade foram superiores aos índices obtidos em solo natural para as cultivares Cristalina, Dare, PI 398733 e FT - 20 mas a diferença não foi significativa para Beeson, IAC 2 e Harosoy. A cultivar Cristalina diferiu de todos os genótipos com exceção de 'Dare', no solo autoclavado. A maior suscetibilidade apresentada por 'Dare' neste experimento pode ser devida à mais alta concentração de inóculo usada. Já em solo natural, os baixos índices de doença obtidos não permitiram uma separação melhor e mais clara entre as cultivares resistentes e 'Cristalina' que diferiu apenas de FT - 20 e FT 81-2559.

Com relação à variável peso seco das raízes (Tabela 8), observou-se uma redução significativa de peso das raízes para a cultivar Cristalina (aproximadamente 70%) no solo autoclavado. Esta redução não foi tão marcante no solo natural (aproximadamente 40%), não sendo assim possível detectar diferenças entre as cultivares com base neste parâmetro (Figura 6). No solo autoclavado, Cristalina diferiu apenas das cultivares FT - 20 e Beeson mas não das demais quanto ao peso seco das raízes (Figura 7).

No experimento conduzido em condições de campo observou-se o efeito do fungo sobre a produção de grãos das diferentes cultivares, em solo fumigado e em solo natural (Tabela 9). Os dados foram analisados utilizando-se a diferença de produção entre uma parcela testemunha e a parcela inoculada. Não se

Tabela 8 - Proporção do peso seco (g) das raízes de diferentes cultivares de soja em relação às suas testemunhas após inoculação de *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587) em condições de casa de vegetação.

Genótipo	solo autoclavado	solo natural
Cristalina	0,331 a ¹ A ²	0,624 a B
PI 398733	0,450 a b A	0,868 a B
Harosoy	0,479 a b A	0,687 a A
Dare	0,481 a b A	0,768 a B
IAC-2	0,575 a b A	0,632 a A
Beeson	0,687 b A	0,889 a B
FT-20	0,709 b A	0,812 a A
FT 81-2559	--	0,827 a
Média	0,530 A	0,763 B

¹ Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

² Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).



Figura 6 - Aspecto das raízes de plantas da cv. Cristalina após 25 dias da inoculação de *Cylindrocladium clavatum* em solo natural (esquerda) e em solo autoclavado (direita).



Figura 7 - Raízes de plantas das cultivares FT - 20 (esquerda) e Cristalina (direita) após 25 dias da inoculação de *Cylindrocladium clavatum* em solo autoclavado.

Tabela 9 - Porcentagem de produção de diferentes cultivares de soja após inoculação de *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587) em solo fumigado e natural.

Cultivar	% Produção ¹	
	solo fumigado ²	solo natural
Cristalina	79,8	119,9
Savana	62,9	102,9
IAC - 2	112,5	107,7
FT - 20	132,8	127,7

¹ % Produção = (produção média de grãos (g) das parcelas inoculadas / produção média de grãos (g) das parcelas testemunhas) x 100.

² Aplicação de 60 ml de brometo de metila/m² de canteiro.

detectou diferença significativa entre cultivares e entre os dois tipos de solo. A interação cultivar x solo também não foi significativa.

A produção de grãos em soja é função de muitos fatores, incluindo clima, adubação, cultivar, umidade, pragas e doenças (MASCARENHAS, 1982). Patógenos do sistema radicular são capazes de causar prejuízos, afetando a produção (YORINORI, 1982; LEATH & CAROLL, 1982; KILLEBREW et al., 1988). Neste experimento, entretanto, apenas foi observada redução na produção das cultivares Savana e Cristalina no solo fumigado. Observou-se que para as cultivares IAC - 2 e FT - 20, e todas as cultivares no solo natural, houve um aumento na produção em relação às parcelas não inoculadas. Não foi possível, também, detectar diferenças no comportamento das cultivares quanto à resistência ao patógeno utilizando-se este parâmetro. Em inoculações artificiais, maiores danos às raízes foram causados quando *C. clavatum*, *Neocosmospora* spp. e *R. solani* estavam presentes, indicando um provável efeito sinérgico entre os mesmos (DIANESE et al., 1986). Provavelmente sob condições favoráveis e interagindo com outros patógenos, *C. clavatum* poderia causar danos significativos à cultura. A Tabela 10 sumariza os dados obtidos para a variável peso de 100 sementes. O efeito da cultivar e da interação cultivar x tipo de solo não foram significativos. Apenas o efeito do tipo de solo foi significativo ao nível de 5%, indicando que no solo fumigado o efeito sobre a redução do peso das sementes foi menor que no solo natural.

Tabela 10 - Porcentagem do peso de 100 sementes de diferentes cultivares de soja após a inoculação de *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587) em relação às suas testemunhas, em solo fumigado e solo natural.

Cultivar	% Peso de 100 sementes ¹	
	solo fumigado ²	solo natural
Cristalina	88,1	76,9
Savana	95,0	96,1
IAC - 2	92,4	92,9
FT - 20	100,0	99,9
Média	93,9 a ³	91,5 b

¹ % Produção = (peso médio de 100 sementes (g) nas parcelas inoculadas / peso médio de 100 sementes (g) nas parcelas testemunhas) x 100.

² Aplicação de 60 ml de brometo de metila/m² de canteiro.

³ Média seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste F (P<0,05).

E R R A T A

PÁGINA

ONDE SE LÊ

LEIA-SE

51

Z PRODUÇÃO

Z PESO DE 100 SEMENTES

A Tabela 11 mostra o número de colônias recuperadas de segmentos de raízes secundárias, das quatro cultivares em estudo nos diferentes tratamentos aplicados ao solo. Observou-se uma maior frequência de isolamentos de *C. clavatum* no solo fumigado e inoculado, para todas as cultivares. Para a cultivar suscetível Cristalina este número foi cinco vezes superior a frequência obtida no solo natural e inoculado. Mesmo no solo natural e não inoculado, a cultivar Savana mostrou uma alta frequência de colônias de *C. clavatum* nas raízes secundárias, que pode ser devido a maior suscetibilidade da cultivar e também a uma disseminação mais rápida da infecção por todo o sistema radicular. Quando se recuperou o patógeno do solo, após quatro meses da inoculação, observou-se uma população maior no solo fumigado e inoculado, comparada aos outros solos (Tabela 12). Os resultados acima obtidos, aliados a maior severidade de doença observada em solo autoclavado que em solo natural, em casa de vegetação, sugerem a ocorrência de supressão do patógeno em solos naturais. Também RIBEIRO & DIANESE (1986) relataram índices de severidade superiores em solos cultivados e autoclavados do que em solos naturais de cerrado.

Solos supressivos são definidos como solos nos quais o desenvolvimento da doença é suprimido mesmo que o patógeno seja introduzido na presença de uma hospedeira suscetível (HUBER & SCHNEIDER, 1982). Embora existam condições favoráveis de umidade, pH, temperatura e outros fatores ambientais, o patógeno não se estabelece no solo, ou estabelece-se mas não produz doença, ou estabelece-se, produz doença por um determinado período,

Tabela 11 - Frequência de colônias de *Cylindrocladium clavatum* isoladas de fragmentos de 1 cm de raízes secundárias de quatro cultivares de soja, submetidas a diferentes tratamentos de solo.

Cultivar	Frequência por 100 fragmentos			
	FI ¹	FNI	NI	NNI
Cristalina	20	11	4	1
Savana	11	4	8	10
IAC - 2	8	2	6	0
FT - 20	10	8	4	5

¹ FI - solo fumigado e inoculado com *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587), aplicando-se 3 ml (10^6 conídios/ml) de inóculo por planta;

FNI - solo fumigado, não inoculado;

NI - solo natural, inoculado;

NNI - solo natural, não inoculado.

Tabela 12 - Número de microesclerócios de *Cylindrocladium clavatum* recuperados por grama de solo, 4 meses após aplicação de diferentes tratamentos ao solo.

Tratamento ¹	Microesclerócios / grama de solo seco
FI	6,1 ²
FNI	0,3
NI	3,4
NNI	2,9

¹ FI - solo fumigado (60 ml de brometo de metila / m²) e inoculado com *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587), aplicando-se 3 ml (10⁶ conídios/ml) de inóculo junto ao colo de cada planta;

FNI - solo fumigado, não inoculado;

NI - solo natural, inoculado;

NNI - solo natural, não inoculado.

² Média por 20 placas (1 ml de suspensão de solo por placa).

decrecendo a doença com a monocultura (BAKER & COOK, 1974, citado por LYDA, 1982). A supressão de determinado patógeno no solo envolve fungistase, habilidade competitiva saprofítica e interações entre microorganismos. Calor, produtos químicos ou esterilização do solo por irradiação, práticas culturais e sequência de culturas são agentes que causam uma grande ruptura no microambiente e mostram a associação da atividade biológica com a supressão de doença no solo (HUBER & SCHNEIDER, 1982.).

C. clavatum é aparentemente suprimido em solos naturais, mesmo quando introduzido na forma de conídios em altas concentrações. Observou-se, também, que este fator de supressão é eliminado após tratamento com calor ou químico - brometo de metila - , indicando-se tratar de um agente biológico. Antagonistas presentes no solo podem evitar que um patógeno introduzido se estabeleça, ou evitar que este cause doença, uma vez já presente no solo, ou ainda, podem causar uma progressiva redução da doença após contínua monocultura (BAKER & COOK, 1974). A supressividade de alguns solos a diferentes patógenos, especialmente a *Rhizoctonia solani* e *Pythium* spp., tem sido atribuída a diferentes espécies de *Trichoderma*, nativas ou introduzidas no solo. A habilidade de *Trichoderma* e *Gliocladium* de atuarem como micoparasitas de hifas e estruturas de resistência de patógenos de plantas já foi demonstrado tanto "in vitro" quanto em solo natural. Também a habilidade de produzir substâncias tóxicas a outros fungos , mesmo em substratos orgânicos no solo, reforça a hipótese que sugere o envolvimento destes gêneros no controle biológico de patógenos do solo

(PAPAVIZAS, 1985). As populações de *Trichoderma* spp. *Gliocladium* sp. associadas à rizosfera e às raízes de soja no Distrito Federal têm-se mostrado altas, sendo de interesse verificar-se a possibilidade de espécies destes gêneros estarem agindo como antagonistas de *C. clavatum*, nestes solos (RIBEIRO & DIANESE, 1984; DIANESE et al. 1986).

3 - Virulência de isolados de *Cylindrocladium clavatum*.

3.1 - Características morfológicas dos isolados.

Todos os treze isolados utilizados nos testes de avaliação de virulência apresentavam conídios hialinos, cilíndricos, unisseptados e um filamento estéril terminando em uma vesícula clavada. O isolado UnB - 971, de *Eucalyptus urophylla*, possui a maioria de seus conídios curvos mas a forma da vesícula e medidas de conídios e vesículas confirmaram aquelas fornecidas por PEERALLY (1974) para *C. clavatum*. Os resultados da Tabela 13 confirmam os dados de PEERALLY (1974), ALFENAS (1986) e HODGES & MAY (1972) quanto ao tamanho dos conídios. As amplitudes observadas para a largura da vesícula (Tabela 14) confirmam a informação de PEERALLY (1974), mas observou-se uma amplitude maior de variação do que aquela relatada por HODGES & MAY (1972) que era de 4,0 - 4,8 u. Com relação ao comprimento da vesícula estes autores observaram valores entre 35 e 60 micrômetros, contudo oito dos treze isolados apresentaram medidas inferiores a 35 micrômetros e a maior frequência de

Tabela 13 - Frequência e porcentagem de conídios por classes de comprimento e largura de *Cylindrocladium clavatum*¹.

Classe de comprimento (u)	frequência	%	Classe de largura (u)	frequência	%
36 - 40	104	16,0	3,6 - 4,0	205	31,5
41 - 45	222	34,1	4,1 - 4,5	160	24,6
46 - 50	260	40,0	4,6 - 5,0	281	43,3
51 - 55	59	9,1	5,1 - 5,5	2	0,3
56 - 60	5	0,8	5,6 - 6,0	2	0,3

¹ Medidas de 650 conídios de 13 isolados de diferentes hospedeiras.

Tabela 14 - Frequência e porcentagem de vesículas por classes de comprimento e largura de *Cylindrocladium clavatum*¹.

Classe de comprimento (u)	frequência	%	Classe de largura (u)	frequência	%
24 - 28	5	2,0	2,4 - 2,8	18	6,9
29 - 33	14	5,3	2,9 - 3,3	0	0,0
34 - 38	125	48,1	3,4 - 3,8	85	32,7
39 - 43	58	22,3	3,9 - 4,3	16	6,2
44 - 48	44	16,9	4,4 - 4,8	134	51,5
49 - 53	13	5,0	4,9 - 5,3	7	2,7
54 - 58	1	0,4	5,4 - 5,8	0	0,0

¹ Medidas de 260 vesículas correspondentes a 13 isolados de diferentes hospedeiras.

vesículas encontrava-se entre 34 e 38 u, equivalente a 48,1% das vesículas medidas. No trabalho de HODGES & MAY não ficou claro como foram feitas as medições das vesículas, o que provavelmente resultou nessas diferenças. Também BLUM (1989) encontrou valores para o comprimento da vesícula, medindo da extremidade até o 1º septo, que não coincidiram com os valores fornecidos por HODGES & MAY. Já neste estudo procurou-se determinar o comprimento da vesícula da sua extremidade até o ponto onde seu diâmetro se iguala ao da estipe (hifa estéril), levando-se em consideração que a vesícula pode ter de 0 a 1 septo.

3.2 - Crescimento micelial e produção de conídios de treze isolados de *C. clavatum*.

Como mostram os dados contidos na Tabela 15, os isolados de *C. clavatum* estudados apresentaram variação quanto ao crescimento micelial e quanto à produção de conídios em meio de malte-levedura-agar. O isolado UnB - 1311 apresentou o menor crescimento micelial medido aos seis dias, que não diferiu dos isolados UnB - 1087, UnB - 1093 e UnB - 1092 mas diferiu significativamente dos demais. Os isolados UnB - 1092 e UnB - 1311 foram, entretanto, os que produziram maior número de conídios por mm² de meio, não diferindo estatisticamente entre si. HODGES & MAY (1972) também detectaram variação quanto a taxa de crescimento e produção de conídios de diferentes isolados originários de diferentes hospedeiras e localidades.

Tabela 15 - Crescimento micelial e produção de conídios de treze isolados de *Cylindrocladium clavatum* em meio de malte-levedura-agar.

número do isolado	diâmetro (mm)	nº de conídios/mm ² (x 10 ³)
UnB - 1194	58,8 a ¹	4,88 a b ²
UnB - 971	57,7 a	1,14 a b
UnB - 1088	56,9 a	1,31 a b
UnB - 1127	56,2 a	3,39 a b
CNPH - 142	55,2 a	1,40 a b
UnB - 970	53,9 a b	1,59 a b
UnB - 876	51,2 a b c	2,89 a b
UnB - 1090	50,8 a b c	3,39 a b
UnB - 894	48,9 a b c d	2,67 a b
UnB - 1087	41,0 b c d e	0,72 a
UnB - 1093	39,0 c d e	1,02 a b
UnB - 1092	36,6 d e	5,35 b
UnB - 1311	34,7 e	5,96 b

¹ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

² Dados foram analisados após transformação para \sqrt{x} .

3.3 - Patogenicidade de um isolado de soja a diferentes espécies de leguminosas.

O isolado de soja ATCC 60587 foi patogênico a todas as espécies testadas (Tabela 16). Em soja, ervilha, feijão e tremoço foram observados sintomas de podridão escura no colo e raiz principal e apodrecimento de algumas raízes secundárias. Em lentilha e grão-de-bico as plantas apresentavam em alguns casos, além de lesões na raiz, amarelecimento e murcha na parte aérea. Algumas plantas de grão-de-bico morreram. Houve pequena variação entre os dois métodos empregados para inoculação. De modo geral a soja foi a hospedeira menos suscetível. ALMEIDA & BOLKAN (1981c) inocularam eucalipto, batata, amendoim e soja com diferentes isolados e relataram também uma menor suscetibilidade da soja em relação às outras hospedeiras. O teste confirmou a patogenicidade de *C. clavatum* à ervilha, grão-de-bico e tremoço e revela a patogenicidade deste isolado de soja ao feijão e à lentilha, embora em condições naturais de campo a doença ainda não tenha sido observada.

3.4 - Virulência de isolados de *C. clavatum* obtidos de onze espécies hospedeiras em soja.

Todos os treze isolados, provenientes de diferentes hospedeiras, foram patogênicos às cultivares de soja selecionadas (Tabela 17). Houve variabilidade na virulência que pode ser observada dentro de cada uma das cultivares. Os

Tabela 16 - Patogenicidade de um isolado de *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587) de soja a diferentes espécies de leguminosas em casa de vegetação.

Espécie	% de plantas com sintomas	
	colo ¹	disco ²
soja 'Cristalina'	60,0	60,0
tremoço-branco (<i>Lupinus albus</i>)	100,0	85,7
ervilha 'Mikado'	100,0	88,8
lentilha 'Precoz'	80,0	75,0
grão-de-bico	100,0	100,0
feijão 'Carioquinha'	100,0	90,0

¹ Deposição de 2 ml de inóculo (3×10^6 conídios/ml) junto ao colo de cada plântula.

² Colocação de discos com 15 mm de diâmetro de colônia esporulada em BDA, 1-2 cm abaixo da linha do solo, usando-se 1 disco por plântula.

Tabela 17 - Índice médio de doença¹ (ID) de plantulas de cultivares de soja inoculadas com diferentes isolados de *Cylindrocladium clavatum*.

isolado UnB nº	ID					
	cultivar/introdução					
	Savana	Cristalina	Harosoy	IAC-2	FT-20	PI 398733
1194	1,7aAB ²	2,0aAB	2,0bcA	1,2aCD	0,8aD	1,3aBC
1311	2,0aBC	2,5bA	1,5aDE	2,3cdAB	1,2abE	1,7abCD
1090	2,0aA	2,3abA	1,5aB	1,3abB	1,2abcB	1,5aB
1087	2,0aAB	2,2aA	1,3aC	1,3abC	1,7cdBC	2,0bcAB
876	2,0abA	2,0aA	1,7abAC	1,7bAC	1,0abB	1,3aBC
1088	2,5bcA	2,3abAB	2,0bcBC	1,7bC	2,2eAB	1,7abC
970	2,7cdAB	3,0cdA	2,5dBC	2,5cdeBC	1,8deD	2,2cCD
1093	3,0deA	2,7bcAB	2,3cdBC	1,8bcCD	1,3bcD	2,0bcc
1127	3,0deAB	3,3dA	2,2cdC	2,8eB	1,8deC	1,3aD
142 ³	3,0deAB	3,0cdA	2,7dAB	2,5cdeB	2,8fAB	2,0bcc
971	3,3efA	3,0cdAB	2,5dBC	2,7deB	2,2eC	2,2cC
1092	3,3efA	3,2dA	2,2cdB	1,7bC	1,8deBC	1,8abcBC
894	3,7fA	3,0cdB	2,5dC	2,2cC	1,7cdD	1,5aD

¹ Média das notas de 6 plântulas baseada em escala de 0 a 4.

² Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, ou letra maiúscula na linha, não diferem entre si pela prova U de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

³ Isolado CNPH.

diferentes isolados não se comportaram da mesma maneira nas cultivares testadas. Da mesma forma, o padrão de resposta das diferentes cultivares não foi o mesmo para todos os isolados testados, sendo que para alguns isolados não foi possível separar cultivares resistentes de suscetíveis. Comparando-se os dois isolados originários de soja foram observadas diferenças de virulência em todas as cultivares, sendo o UnB - 894 mais virulento que o UnB - 876, no entanto, para o PI 398733 os dois isolados não diferiram em virulência. Também os quatro isolados originários de *Vochysia* spp, um gênero nativo dos cerrados, apresentaram variação quanto à virulência. Em todas as cultivares, com exceção do PI 398733, diferenças significativas foram observadas entre as médias destes isolados. Os resultados indicam a ocorrência de interação entre isolado e hospedeira, o que sugere a existência de um potencial para especialização fisiológica do patógeno. A variabilidade existente na espécie, associada ao seu amplo círculo de hospedeiras, são fatores que podem influenciar no desenvolvimento de raças. Neste experimento foi verificado que isolados de diferentes hospedeiras são patogênicos à soja, inclusive isolados de plantas originadas de solos de cerrado não cultivados, como *Vochysia* spp. Também BOLKAN et al. (1981) verificaram que um isolado de batata era patogênico a amendoim, eucalipto, soja e pimentão. Diversos isolados do solo foram patogênicos a soja, eucalipto, amendoim e batata (ALMEIDA & BOLKAN 1981 c). MORAES (1980) também verificou a ação patogênica de um isolado de *Pinus* sp. em amendoim. Variações na virulência entre isolados de *C. clavatum* foram

também relatadas por HOMECHIM & KRUGNER (1980), quando diferentes isolados foram testados em *Pinus* spp.

4 - Método de inoculação no hipocótilo para seleção de plântulas de soja resistentes à *Cylindrocladium clavatum*.

Em experimentos preliminares observou-se que o ferimento no hipocótilo acelerava o processo de aparecimento de sintomas. Ao depositar a gota de inóculo no hipocótilo não ferido, lesões apareciam após o terceiro dia da inoculação. No hipocótilo ferido já se podiam notar lesões entre 16 e 24 horas após inoculação. Inoculações na cultivar Cristalina (suscetível) e FT-20 (resistente) mostraram diferenças quanto à suscetibilidade das duas cultivares que puderam ser detectadas após 24 horas da inoculação (Tabela 18). Em três dias de observação verificou-se sempre diferenças significativas entre as duas cultivares, com exceção da avaliação feita após 24 horas nas plântulas inoculadas com baixa concentração de inóculo (10^3 conídios/ml). Após o quinto dia houve pouca ou nenhuma variação quanto ao desenvolvimento das lesões. Na cultivar Cristalina houve um rápido progresso da doença principalmente na concentração mais elevada de $1,6 \times 10^6$ conídios/ml. Aos 3 dias a média das notas nesta concentração foi 4,0, ocorrendo total necrose dos tecidos e estrangulamento das plântulas. Não se observou morte de plântulas na cultivar resistente. Esta apresentou lesões com desenvolvimento mais lento. Em FT - 20 o índice máximo obtido foi de 3,3 para a concentração de 10^6 conídios/ml.

Tabela 18 - Índice médio de doença¹ (ID) de plântulas das cultivares Cristalina e FT-20 após inoculação de *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587) no hipocótilo.

Concentração de inóculo (conídios/ml)	ID Dias após a inoculação					
	1		3		5	
	C ²	F ³	C	F	C	F
1,6 × 10 ³	0,4a ⁴ A ⁵	0,1aA	1,6aA	0,1aB	1,9aA	0,3aB
1,6 × 10 ⁴	0,9bA	0,4aB	2,4aA	0,5aB	3,0bA	0,9bB
1,6 × 10 ⁵	1,9cA	1,0bB	3,8bA	2,4bB	3,9cA	2,4cB
1,6 × 10 ⁶	2,6dA	1,5cB	4,0bA	3,1bB	4,0cA	3,3dB

¹ Média das notas de 8 plântulas baseada em escala de 0 a 4.

² Cristalina.

³ FT - 20.

⁴ Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pela prova U de Mann-Whitney (P<0,05).

⁵ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, para cada dia de avaliação, não diferem entre si pela prova U de Mann-Whitney (P<0,05).

Em um segundo experimento o método foi aplicado a diferentes cultivares com diferentes níveis de suscetibilidade à inoculação na raiz. Usando-se suspensões com $1-2 \times 10^4$ conídios/ml, inoculou-se as cultivares e linhagens resistentes pertencentes a classe 1: FT 81-2559, Dare, PI 398733, FT - 20, IAC - 2, Beeson e Harosoy; cultivares da classe 2, intermediária resistente: PI 417422 e FT -18 (Xavante); cultivares da classe 3, intermediária suscetível: Cristalina e FT - 11 e cultivares da classe 4, suscetível: Savana e Bragg. Os dados contidos na Tabela 19 mostram que diferenças entre os genótipos puderam ser detectadas, aos 2 e aos 5 dias após a inoculação. Com 2 dias o genótipos da classe 1 apresentaram índices inferiores a 1,5. Com exceção de 'Beeson', as médias desses genótipos foram estatisticamente diferentes das dos demais genótipos de reação intermediária e suscetível. As cultivares pertencentes às classes intermediárias não puderam ser separadas, com base no índice de doença no hipocótilo, daquelas mais suscetíveis. Aos 5 dias as cultivares FT 81-2559, Dare, PI 398733, FT - 20, IAC - 2 e Harosoy apresentaram índices significativamente inferiores, podendo ser claramente separadas das cultivares suscetíveis como Cristalina (Figura 8). As cultivares Beeson e Bragg apresentaram comportamento diferente do que quando inoculadas na raiz. Ambas apresentaram reação moderada com índices de 1,8 e 2,1, respectivamente.

O método de inoculação no hipocótilo permitiu uma separação clara entre cultivares resistentes e suscetíveis em apenas cinco dias. Todos os genótipos que haviam mostrado suscetibilidade na

Tabela 19 - Índice médio de doença¹ (ID) de plântulas de diferentes genótipos de soja após inoculação de *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587) no hipocótilo.

Genótipos	ID	
	Dias após inoculação	
	2	5
IAC - 2	0,4 a ²	1,0 a
FT 81-2559	0,5 a	1,3 a b
Harosoy	0,6 a	1,1 a
PI 398733	0,6 a	1,2 a b
Dare	0,6 a	1,3 a b
FT - 20	0,6 a	1,3 a b
Beeson	1,4 b	1,8 b c
Bragg	1,6 b c	2,1 c
PI 417422	1,7 b c d	2,6 c d
Cristalina	2,0 c d e	3,1 d
FT - 18 (Xavante)	2,3 d e	3,0 d
FT - 11 (Alvorada)	2,3 d e	3,1 d
Savana	2,4 e	2,9 d

¹ Média das notas de 8 plântulas baseada em escala de 0 a 4.

² Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pela prova U de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

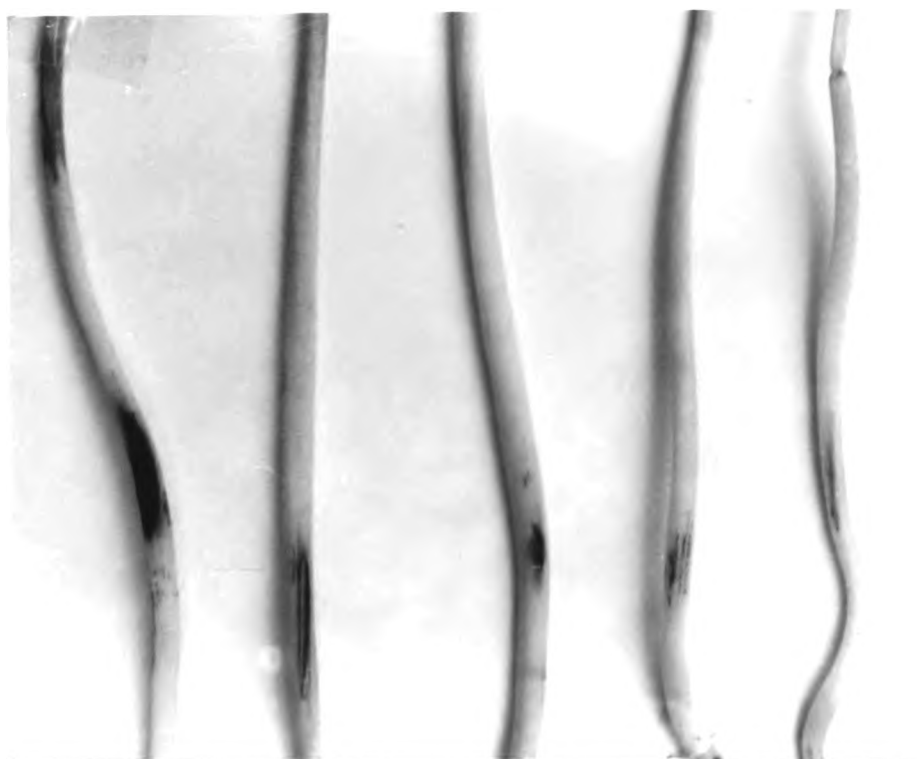


Figura 8 - Lesões de *Cyindrocladium clavatum* no hipocótilo de plântulas das cultivares Cristalina, Savana, FT - 20, IAC - 2 e PI 398733 após 5 dias da inoculação.

raiz também apresentaram suscetibilidade no hipocótilo, o mesmo ocorrendo para as resistentes. No entanto é possível ocorrer que genótipos como Bragg, suscetível na raiz, sejam selecionados por apresentar reação moderada no hipocótilo. O uso de concentrações mais elevadas de inóculo (10^5 conídios/ml), aliado a avaliações prolongadas por mais que 5 dias, poderá minimizar o problema. Além de prático e rápido, este método de inoculação possui a vantagem de não ser destrutivo, permitindo que plântulas selecionadas para resistência possam ser transplantadas para vaso e, desta maneira, aproveitadas em programas de seleção e melhoramento.

5 - Inoculação foliar em cultivares resistentes e suscetíveis.

Após 48 horas da inoculação em folhas destacadas e mantidas em meio de AAC, as reações das cultivares Cristalinas e FT - 20 podiam ser quantificadas através da medida do diâmetro da lesão (Tabela 20). As diferenças entre as duas cultivares quanto à suscetibilidade na folha foram significativas 2 e 7 dias após a inoculação, conforme mostrou a análise de variância. Cristalina produziu lesões necróticas de halo amarelado que evoluíram rapidamente, atingindo um diâmetro de até 18,6 mm na mais alta concentração de inóculo, enquanto que para FT - 20 o diâmetro da lesão chegou a 9,9 mm, permitindo separar facilmente as duas cultivares. A interação cultivar x concentração não foi significativa em nenhuma das três datas de avaliação.

O método foi aplicado aos demais genótipos com diferentes

Tabela 20 - Diâmetro médio (mm) das lesões produzidas em folhas destacadas das cultivares Cristalina e FT - 20 após inoculação de *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587) em diferentes concentrações.

Concentração de inóculo (cônídios/ml)	Diâmetro Dias após a inoculação					
	2		5		7	
	C ¹	F ²	C	F	C	F
1,5 x 10 ⁴	4,8 a ³ A ⁴	2,0 aB	6,1 aA	5,8 aA	9,5 aA	6,2 aB
1,5 x 10 ⁵	7,1 abA	3,1 aB	7,8 abA	6,2 aA	10,9 aA	7,1 aB
1,5 x 10 ⁶	8,8 bA	4,7 aB	13,6 bA	7,9 aB	18,6 bA	9,9 aB

¹ Cristalina.

² FT - 20.

³ Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

⁴ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

níveis de suscetibilidade e os resultados estão contidos na Tabela 21. Com base na reação à inoculação foliar, de modo geral, todas as cultivares que haviam apresentado resistência na raiz, apresentaram também resistência na folha, com diâmetro de lesões significativamente menores que Cristalina (Figura 9). Aos 7 dias FT - 18, Savana e Cristalina mostraram-se mais suscetíveis que todos os genótipos da classe 1 com diâmetro de lesões maiores. A cultivar mais resistente na folha foi a linhagem FT 81-2559, que não diferiu das demais cultivares pertencentes a classe 1 de resistência na raiz. Da mesma forma que o método do hipocótilo, a inoculação foliar não separou os genótipos de reação intermediária de resistência, FT - 18 e PI 417422, das cultivares mais suscetíveis.

A Tabela 22 mostra os coeficientes de correlação entre as três variáveis em estudo. Todos os coeficientes foram altos e significativos com probabilidades inferiores a 1%. O maior coeficiente de correlação observado (0,7895) foi obtido entre índice de doença na raiz e diâmetro de lesão na folha, indicando que a inoculação foliar pode também ser utilizada como método para seleção de cultivares resistentes à podridão de raiz causada por *C. clavatum*. O método de inoculação em folhas destacadas tem-se mostrado bastante útil nos estudos das interações entre hospedeiras e patógenos, com diferentes finalidades e apresentando altas correlações com as reações em campo e em casa de vegetação (MENDES & BERGAMIN FILHO, 1986). No presente trabalho o método mostrou-se eficiente pois permitiu o estudo da interação *C. clavatum* - soja na folha e, com isto,

Tabela 21 - Diâmetro médio das lesões (mm) produzidas em folhas destacadas de diferentes genótipos de soja após inoculação de *Cylindrocladium clavatum* (ATCC 60587).

Genótipos	Diâmetro das lesões (mm)			
	Dias após inoculação			
	2		7	
FT 81-2559	0,6	a ¹	2,9	a
Beeson	0,6	a	4,8	a b
Dare	1,1	a b	5,3	a b
Harosoy	2,2	a b c	8,8	a b c
FT - 20 (Jaú)	3,1	a b c d	5,6	a b
IAC - 2	3,3	a b c d e	8,7	a b c
PI 398733	3,6	b c d e	9,3	a b c d
FT - 11 (Alvorada)	4,1	c d e	12,5	b c d e
FT - 18 (Xavante)	4,7	c d e f	19,3	e
Savana	5,0	d e f	20,2	e
Bragg	5,7	d e f	15,6	c d e
PI 417422	6,0	e f	17,4	d e
Cristalina	6,9	f	18,9	e

¹ Média de 5 repetições. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

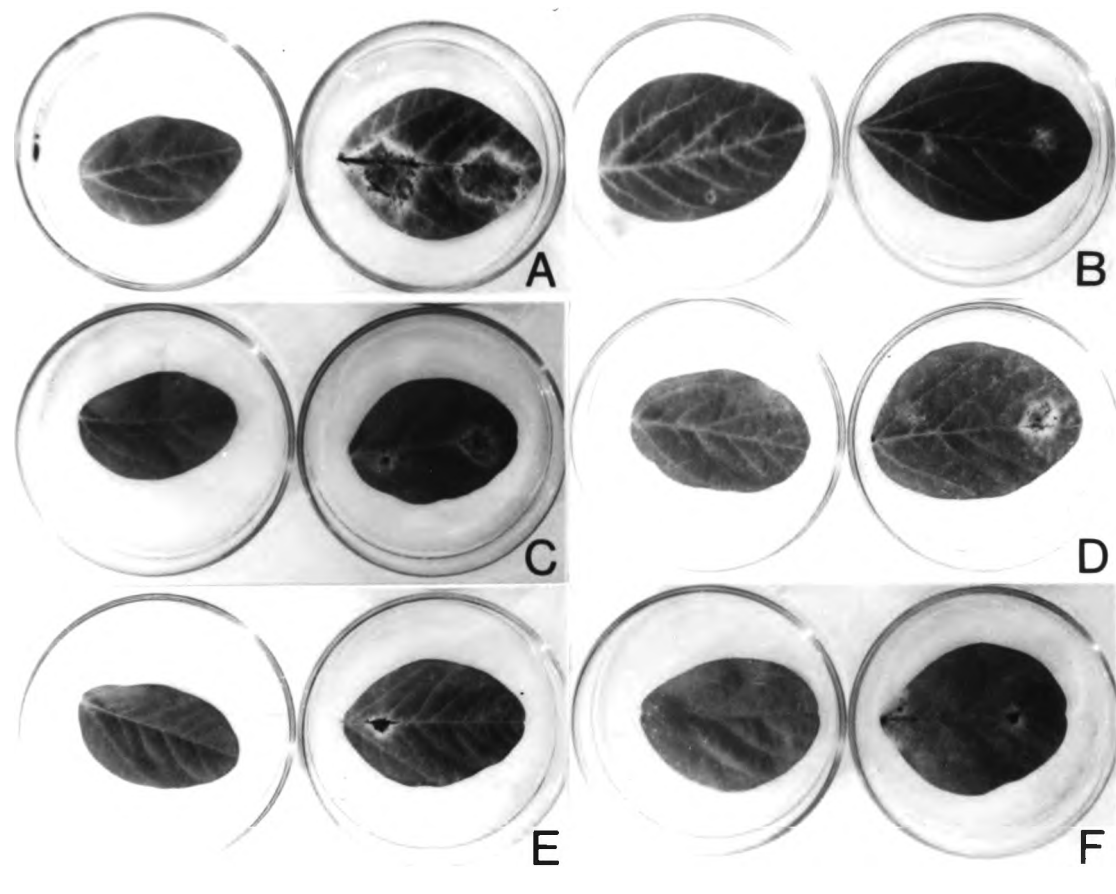


Figura 9 - Lesões de *Cylindrocladium clavatum* em folhas de soja em meio de agar-água com cinetina: controle (esquerda) e folha inoculada (direita) de (A) cv. Cristalina, (B) FT 812559, (C) Harosoy, (D) PI 398733, (E) FT - 20 e (F) Beeson.

Tabela 22 - Coeficientes de correlação de Spearman entre índice médio de doença na raiz , índice médio de doença no hipocótilo e diâmetro médio da lesão na folha.

Comparação	Coeficiente de correlação (r_s)	Probabilidade
Raiz/Hipocótilo	0,6890	0,005
Raiz/Folha	0,7895	0,001
Hipocótilo/Folha	0,6446	0,009

separar quantitativamente diferentes níveis de resistência ao patógeno.

A patogenicidade de *C. clavatum* à folha e tecidos da parte aérea já foi constatada em: caupi (CARDOSO et al., 1980), amendoim (MORAES, 1980), cacauzeiro (FEITOSA et al., 1984), eucalipto (RATTAN et al., 1983) e *Vochysia* spp (DIANESE et al., 1988). Em soja, contudo, lesões foliares nunca foram constatadas em condições de campo, talvez pela sua baixa incidência ou por serem confundidas com lesões causadas por outros patógenos. Em amendoim, cuja parte aérea é também afetada por *C. crotonariae*, foi constatado que microesclerócios formados dentro da raiz e mantidos em restos culturais podiam ser liberados no solo e dispersarem-se localmente pela ação do vento, disseminando o patógeno a curtas distâncias (ROWE et al., 1974). De maneira semelhante, sob condições favoráveis, a disseminação de *C. clavatum* poderia ocorrer causando lesões foliares em soja, mas ainda não observadas em condições de campo.

Concluindo-se, foi possível selecionar genótipos de soja resistentes à podridão de raízes causada por *Cylindrocladium clavatum*, sob condições controladas, através de um método rápido com economia de espaço e tempo. Métodos de inoculação no hipocótilo e folha também foram desenvolvidos e mostraram-se eficientes e, em geral, confirmaram os dados obtidos por inoculação na raiz. Observou-se, ainda, variabilidade de virulência entre isolados de diferentes hospedeiras em seis genótipos de soja. Resultados obtidos em casa de vegetação e campo indicam a ocorrência de supressão de *C. clavatum* em solos

naturais. Possivelmente antagonistas estariam exercendo um controle biológico, responsável pela manutenção da doença em baixos níveis.

RESUMO

Foi desenvolvido um método rápido para seleção de germoplasma de soja resistente à *Cylindrocladium clavatum*, componente principal de um complexo que ataca as raízes de soja no Distrito Federal. A seleção precoce é feita após pré-germinação das sementes por 5 dias em germinador a 25°C e inoculação de plântulas selecionadas por imersão das raízes em 40 ml de suspensão de esporos (4×10^4 conídios/ml) por 1 hora. Em seguida as plântulas foram transferidas para câmara úmida e incubadas por 6 dias a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas. A avaliação foi feita com base em escala de notas de zero a 4 (zero - raízes sem sintomas visíveis e 4 - raízes totalmente danificadas e apodrecidas). Dentre 457 genótipos testados, 7 foram considerados resistentes com índice de doença inferior a 1,5: FT - 20, FT 81-2559, Harosoy, Beeson, IAC - 2, Dare e PI 398733. Cerca de 94% do material testado apresentou reação intermediária; 21 genótipos mostraram-se altamente suscetíveis com índices superiores a 3,0. Os resultados obtidos em câmara de crescimento foram confirmados em casa de vegetação, onde todos os genótipos resistentes, com exceção de Dare, diferiram significativamente de Cristalina. Já em solo natural os baixos índices de doença obtidos não permitiram uma separação mais clara entre genótipos suscetíveis e resistentes. A cultivar Cristalina apenas diferiu de FT - 20 e FT 81-2559 neste tipo de solo. Em condições de campo não houve diferenças significativas

entre cultivares quando se avaliou a redução na produção de grãos e no peso de 100 sementes, tanto em solo fumigado quanto em solo natural. Em solo fumigado e inoculado com *C. clavatum* foi encontrada uma maior população do patógeno (microesclerócios / g de solo) do que em solo natural e inoculado. Também o número de colônias do fungo, isoladas de raízes secundárias, foi superior no solo fumigado e inoculado, tanto para as cultivares suscetíveis (Savana e Cristalina) quanto para as resistentes (FT - 20 e IAC - 2). Estes resultados, aliados aos maiores índices de severidade de doença obtidos, em casa de vegetação, em solo autoclavado, indicam a ocorrência de supressão do patógeno nos solos naturais.

Foram observadas correlações altas e significativas entre resistência na raiz, no hipocótilo e folha sob condições controladas. Os métodos utilizados para inoculação em folhas destacadas e hipocótilo são simples, mais rápidos e práticos e poderão ser utilizados em futuros programas de seleção.

Observou-se ainda variação entre os isolados de *C. clavatum* quanto ao tamanho de conídios e vesículas, e variabilidade quanto ao crescimento radial e produção de conídios em meio de malte-levedura-agar e quanto à virulência em seis genótipos de soja.

SUMMARY

A growth-chamber method was developed for screening soybean germoplasm for resistance to *Cylindrocladium clavatum*, the main component of a root rot complex affecting soybeans in the Cerrado soils of Brasília. Screening was carried out at the seedling stage allowing for rapid development of symptoms. The method consisted in germinating soybean seeds for five days at 25°C on moist "Germtest" paper, before inoculation of the seedlings by dipping their roots for one hour in 40 ml of a spore suspension (4×10^4 conidia of *C. clavatum* per ml). Seedlings were then grown on a third layer of germinating paper in a moist chamber and incubated for 6 days at 25°C, with a 12 hour photoperiod. Disease severity ratings were based on a zero-to-4-scale. Among 457 soybean genotypes tested by this method, the following were rated resistant, having disease indices (DIs) under 1,50 : FT - 20, FT 81-2559, Harosoy, Beeson, IAC - 2, Dare and PI 398733. About 94% of the tested materials had intermediary reactions and 21 genotypes were highly susceptible with DIs above 3,00. Results obtained in the growth chamber were confirmed in plants growing in pots in greenhouse, where resistant genotypes, except Dare, had lower disease ratings than susceptible cultivar Cristalina. In natural soil, the low disease ratings obtained, didn't allow for a clear separation between resistant and susceptible genotypes. Cultivar Cristalina had significant higher disease ratings only when compared to

FT - 20 e FT 81-2559 in this soil. Under field conditions, no significant differences were found among cultivars when seed yield and size were compared in fumigated and natural soils.

In red-latosol fumigated and infested with *C. clavatum* a higher population (microsclerotia per g of soil) of the pathogen was detected when compared to natural and infested soil. The number of fungal colonies isolated from secondary roots of susceptible cultivars (Savana and Cristalina) as well as from resistant cultivars (FT - 20 and IAC - 2) was also higher in soils which were fumigated and then infested with *C. clavatum*. These results together with greater DIs found in greenhouse experiments when autoclaved soil was used, indicated suppression of the pathogen in natural soils.

High and significant correlations were found between resistance shown by roots, hypocotyls and leaves under controlled conditions. Inoculation on detached leaves and hypocotyls are simple and practical, and can be used to expand this selection program.

Morphological variations (size of conidia and vesicles) were found among isolates of *C. clavatum* as well as in radial growth, production of conidia in malt-yeast extract-agar and in virulence on six genotypes of soybean.

LITERATURA CITADA

- AGROANALYSIS. 1988. Fundação Getúlio Vargas. vol. 12.
- ALFENAS, A.C. 1986. Fungos do gênero *Cylindrocladium* como patógenos florestais no Brasil. Fitopatol. Bras. 11:275-277.
- ALFENAS, A.C., A.M. MOREIRA, e N.L. DEMUNER. 1988. *Cylindrocladium clavatum* como agente etiológico do tombamento de mudas de *Eucalyptus cloeziana*. Fitopatol. Bras. 13:126.
- ALMEIDA, O.C., C.F. ROBBS, e F. AKIBA. 1978. Folhas de mamona (*Ricinus comunis*) como isca para desenvolvimento de *Cylindrocladium* spp no solo. Fitopatol. Bras. 3:75-76.
- ALMEIDA, O.C., e H.A. BOLKAN. 1980. Novo meio seletivo para isolamento quantitativo do gênero *Cylindrocladium* do solo através dos microesclerócios. Fitopatol. Bras. 5:381-382.
- ALMEIDA, O.C., e H.A. BOLKAN. 1981 a. Efeitos da umidade do solo e da temperatura de incubação na sobrevivência de *Cylindrocladium clavatum*. Fitopatol. Bras. 6:165-171.
- ALMEIDA, O.C., e H.A. BOLKAN. 1981 b. Ocorrência e distribuição do gênero *Cylindrocladium* Morgan no Distrito Federal. Fitopatol. Bras. 6:223-228.
- ALMEIDA, O.C., e H.A. BOLKAN. 1981 c. Patogenicidade de quatro espécies de *Cylindrocladium* em amendoim, soja, eucalipto e tubérculos de batata. Fitopatol. Bras. 6:237-244.

- ALMEIDA, O.C., G.H.N. OLIVEIRA, e R.L.D. RIBEIRO. 1982. Nova doença da mandioca causada por *Cylindrocladium clavatum*. Fitopatol. Bras. 7:145-147.
- ANDRADE, A.M., C.A. LOPES, e F.J.B. REIFSCHNEIDER. 1978. Efeito de fungicidas na inibição de *Cylindrocladium clavatum* "in vitro" em tubérculos de batata. Fitopatol. Bras. 8:403-408.
- BAKER, K.F. e R.J. COOK. 1974. Biological Control of Plant Pathogens. W.H. Freeman and Company. San Francisco. 433p.
- BARNARD, E.L., N.E. EL-GHOLL, T.S. SCHUBERT, e R.M. LEAHY. 1989. *Cylindrocladium clavatum* in Florida. Plant Disease 73:273.
- BEEK, M.A., L.B. GIORDANO, P.F. ROSSI, e C.R.B. OLIVEIRA. 1985. Método de seleção para resistência parcial de ervilha (*Pisum sativum* L.) para oídio (*Erysiphe pisi* D.C.). Fitopatol. Bras. 10:288.
- BITTENCOURT, C., C. OLIVEIRA, F.J.B. REIFSCHNEIDER, e N.Y. TATEISHI. 1985. Levantamento de doenças da ervilha (*Pisum sativum*) no Distrito Federal. Fitopatol. Bras. 10:185-194.
- BLUM, L.E.B. 1989. Seleção de eucalipto resistente ao tombamento e à mancha foliar causados por *Cylindrocladium clavatum* e *C. scoparium*. Tese de Mestrado, Universidade de Brasília. 69p.
- BOLKAN, H.A., J.C. DIANESE, W.C. RIBEIRO, e O.C. ALMEIDA. 1980. Disease caused by *Cylindrocladium* on potato tubers in Brazil. Plant Disease. 64:225.

- BOLKAN, H.A., W.R.C. RIBEIRO, e O.C. ALMEIDA. 1981. Pathogenicity of *Cylindrocladium clavatum* causing potato tuber rot. Plant Disease. 65:47-49.
- CARDOSO, E.J.B.N. 1980. Doenças da soja. In: GALLI, F. Manual de fitopatologia. vol 2. Ceres. São Paulo. 587 p.
- CARDOSO, J.E., A.C. HILDBRANDT, e C.R. GRAU. 1978. Evaluation of soybean germplasm for resistance to *Rhizoctonia solani* Kuhn. Fitopatol. Bras. 3:205-209.
- CARDOSO, J.E., F.C.O. FREIRE, e F.C. ALBUQUERQUE. 1980. Mancha foliar do caupi causada por *Cylindrocladium clavatum* Hodges e May. Fitopatol. Bras. 5:121-123.
- CARVALHO, A.O., F. AKIBA, J.P. PIMENTEL, R.L.D. RIBEIRO, e D.V. RIBEIRO. 1986. Tombamento de plântulas de algarobeira causado por *Cylindrocladium clavatum*. Fitopatol. Bras. 11:397.
- CNPSO. 1987. A soja no Brasil: História e Estatística. Londrina, PR. 61p.
- DATNOFF, L.E., e J.B. SINCLAIR. 1988. The interaction of *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* in causing root rot of soybeans. Phytopathology 78:771-777.
- DHINGRA, O.D., e J.B. SINCLAIR. 1985. Basic Plant Pathology Methods. CRC Press, Inc. Florida. 334 p.

- DIANESE, J.C., M.A.S.V. FERREIRA, L.E.B. BLUM, J.E. CARES, e M. HARIDASAN. 1988. Root rot and seedling blight caused by *Cylindrocladium clavatum* in *Vochysia* spp. a native species from the cerrado. *Fitopatol. Bras.* 13:141.
- DIANESE, J.C., W.R.C. RIBEIRO, e A.F. URBEN. 1986. Root rot of soybean caused by *Cylindrocladium clavatum* in Central Brazil. *Plant Disease* 70:977-980.
- DIANESE, J.C., W.R.C. RIBEIRO, e C.S. HUANG. 1984. Podridão radicular da soja causada principalmente por *Cylindrocladium clavatum* Hodges e May em Brasília - DF. *Fitopatol. Bras.* 9:316.
- DIANESE, J.C., W.R.C. RIBEIRO, R.D. SHARMA, M.A.S.V. FERREIRA, e A.F. URBEN. 1987. Chickpea: a new host of *Cylindrocladium clavatum*. *Fitopatol. Bras.* 12:403-404.
- FEITOSA, M.I., V.P. OLIVEIRA, C.P.V. PIMENTEL, e B. FARIA. 1984. Ocorrência de um fungo do gênero *Cylindrocladium* em cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) no Estado de São Paulo. *Fitopatol. Bras.* 9:319.
- FERREIRA, L.P., P.S. LEHMAN, e A.M.R. ALMEIDA. 1979. Doenças da soja no Brasil. Londrina, CNPSO. 42 p.
- FIGUEIREDO, M.B., e C.P.V. PIMENTEL. 1975. Métodos utilizados para conservação de fungos na micoteca da Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico. *Summa Phytopathologica* 1:299-302.

- GIESSEN, A.C.V., e A.V. STEENBERGEN. 1957. A new method of testing beans for anthracnose. *Euphytica* 6:90-93.
- GILIOLI, J.L., F. TERASAWA, R. TRECENTI, O.P. ARTIAGA, e B.M. FERREIRA. 1988. Descrição e uso de cultivares de soja para a região dos cerrados. FT - Pesquisa e Sementes. Brasília, DF. 27 p.
- GOMES, F.P. 1982. Curso de Estatística Experimental. 10a ed. Piracicaba, Livraria Nobel S.A. 430p.
- HODGES, C.S., e L.C. MAY. 1972. A root disease of pine, *Araucaria* and *Eucalyptus* in Brazil caused by a new species of *Cylindrocladium*. *Phytopathology* 62:898-901.
- HOMECHIN, M. e T.L. KRUGNER. 1980. Avaliação da patogenicidade de três isolados de *Cylindrocladium clavatum* Hodges & May em árvores de *Pinus caribae* var. *hondurensis* Barret & Golfari e *P. oocarpa*. *Summa Phytopathologica* 6:107-115.
- HUBER, D.M., e R.W. SCHNEIDER. 1982. The Description and Occurrence of Suppressive Soils. In: R.W. Schneider ed. *Suppressive Soils and Plant Disease*. Amer. Phytopathol. Soc. St. Paul. MN.
- HUNTER, B.B., e H.L. BARNETT. 1976. Production of microesclerotia by species of *Cylindrocladium*. *Phytopathology* 66:777-780.

- KILLEBREW, J.F., K.W. ROY, G.W. LAWRENCE, K.S. McLEAN, e H.H. HODGES. 1988. Greenhouse and field evaluation of *Fusarium solani* pathogenicity to soybean seedlings. Plant Disease 72:1067-1070.
- KRIGSVOLD, D.T., e G.J. GRIFFIN. 1975. Quantitative isolation of *Cylindrocladium crotalariae* microesclerotia from naturally infested peanut and soybean field soils. Plant Dis. Rep. 59:543-546.
- LAZAROVITS, G., C.H. UNWIN, e E.W.B. WARD. 1980. Rapid assay for systemic fungicides against Phytophthora rot of soybeans. Plant Disease 64:163-165.
- LEATH, S., e R.B. CARROLL. 1982. Screening for resistance to *Fusarium oxysporum* in soybean. Plant disease 66:1140-1143.
- LINDERMAN, R.G. 1972. Isolation of *Cylindrocladium* from soil or infected azalea stems with azalea leaf traps. Phytopathology 62:736-739.
- LOPES, C.A., e F.J.B. REIFSCHNEIDER. 1982. Pathogenicity of *Cylindrocladium clavatum* to pea, a new host, and preliminary evaluation of its virulence. Plant Disease 66:951-953.
- LOPES, C.A., e M.M. MENDONÇA. 1980. Olho pardo da batata causado por *Cylindrocladium clavatum*. Pesq. Agropec. Bras. 15:123-125.

- LOPES, C.M.C., J.C. DIANESE, e J.F.W. BULLOW. 1988. Root rot of *Lupinus albus* and *L. mutabilis* caused by *Cylindrocladium clavatum* Hodges e May. *Fitopatol. Bras.* 13:100.
- LYDA, S.D. 1982. Physical and Chemical Properties of Suppressivive Soils. In: R.W. Schneider ed. *Suppressive Soils and Plant Disease*. Amer. Phytopathol. Soc. St. Paul. MN.
- MADUEWESI, J.N.C., e J.L. LOCKWOOD. 1976. Test tube method of bioassay for *Thielaviopsis basicola* root rot of soybean. *Phytopathology* 66:811-814.
- MASCARENHAS, H.A.A. 1982. Estimativa da produção da soja. In: Fundação Cargill. ed. *A Soja no Brasil Central*. 2a ed. Campinas. 444 p.
- MENDES, B.M.J., e A. BERGAMIN FILHO. 1986. Adaptação da técnica da cultura de folha destacada para quantificação dos parâmetros epidemiológicos monocíclicos da ferrugem do feijoeiro. *Fitopatol. Bras.* 11:103-114.
- MENEZES, J.R. e J.C. DIANESE. 1988. Race Characterization of Brazilian Isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* and Detection of Resistance to Anthracnose in *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology* 78:650-655.
- MORAES, S.A. 1980. Podridão de raízes, "pegs" e vagens em plantas de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) causada por *Cylindrocladium clavatum* Hodges e May. *Summa Phytopatologica* 6:152-158.

- MYASAKA, S. 1982. Generalidades. In: Fundação Cargill ed. A Soja no Brasil Central, 2a ed. Campinas. 444 p.
- OOKA, J.J., e J.Y. UCHIDA. 1982. *Cylindrocladium* root and crown rot of alfalfa in Hawaii. Plant Disease 66:947-948.
- PAPAVIZAS, G.C. 1985. Trichoderma and Gliocladium: Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol. Ann. Rev. Phytopathol 23:23-54.
- PEERALLY, A. 1974. *Cylindrocladium clavatum*. nº. 422. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonw. Mycol. Inst., Kew, Surrey, England.
- PHIPPS, P.M., e M.K. BEUTE. 1977. Influence of soil temperature and moisture on the severity of *Cylindrocladium* black rot in peanut. Phytopathology 67:1104-1107.
- PHIPPS, P.M., M.K. BEUTE, e K.R. BARKER. 1976. An elutriation method for quantitative isolation of *Cylindrocladium crotaleariae* microsclerotia from peanut field soil. Phytopathology 66:1255-1259.
- PRASAD, K., e J.L. WEIGLE. 1976. Association of seed coat factors with resistance to *Rhizoctonia solani* in *Phaseolus vulgaris*. Phytopathology 66:342-345.
- RATTAN, G.S., R.S. DHANDA, e H.S. RANDHAWA. 1983. Studies on *Cylindrocladium clavatum*. The cause of seedling disease of *Eucalyptus* hybrid. The Indian Forester 109:562-565.

- RIBEIRO, W.R.C., e J.C. DIANESE. 1984. Fungos associados à rizosfera da soja em Brasília. *Fitopatol. Bras.* 9:331.
- RIBEIRO, W.R.C., e J.C. DIANESE. 1986. Lesões foliares e outros aspectos da patogenicidade de *Cylindrocladium clavatum* em soja. *Fitopatol. Bras.* 11:395.
- ROBBS, C.F., C.V.S. SADI e A.R. GRECO. 1989. Podridão de estacas de roseira em casa de vegetação e estratégias de controle. *Fitopatol. Bras.* 14:152.
- ROWE, R.C., S.A. JOHNSTON, e M.K. BEUTE. 1974. Formation and dispersal of *Cylindrocladium crotalariae* microesclerotia in infected peanut roots. *Phytopathology* 64:1294-1297.
- SICHMANN, W. 1982. A cultura da soja. In: Fundação Cargill ed. *A Soja no Brasil Central*, 2a ed. Campinas. 444 p.
- SIEGEL, S. 1975. Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento. McGraw-Hill. Rio de Janeiro. 350 p.
- SINCLAIR, J.B. 1982. (ed.) *Compendium of soybean diseases* 2nd. ed. Amer. Phytopathol. Soc. St. Paul. MN. 104 p.
- ~~YORINORI~~, J.T. 1982. Doenças da Soja no Brasil. In: Fundação Cargill ed. *A Soja no Brasil Central*, 2a ed. Campinas. 444 p.