

Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias  
Câmpus de Jaboticabal

**INFLUÊNCIA DE *Colletotrichum dematium* var.  
*truncata*, *Phomopsis sojae* E *Diaporthe phaseolorum* f.  
sp. *meridionalis* NOS TESTES DE VIGOR DE  
SEMENTES DE SOJA**

**Carolina Fonseca Pereira**  
**Engenheira Agrônoma**

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Janeiro de 2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias  
Câmpus de Jaboticabal

**INFLUÊNCIA DE *Colletotrichum dematium* var.  
*truncata*, *Phomopsis sojae* E *Diaporthe phaseolorum* f.  
sp. *meridionalis* NOS TESTES DE VIGOR DE  
SEMENTES DE SOJA**

**Carolina Fonseca Pereira**

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Rita de Cássia Panizzi**

**Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Margarete Camargo**

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Janeiro de 2008

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**CAROLINA FONSECA PEREIRA** – nascida em 29 de Julho de 1978, em Araraquara, SP, é Engenheira Agrônoma, formada pela Faculdade de Agronomia Dr. Francisco Maeda - FAFRAM, em 20 de Julho de 2001. Iniciou Mestrado em Agronomia na área de Produção e Tecnologia de Sementes em março de 2005, obtendo o título de Mestre em 2008 na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal.

“O Senhor é o meu Pastor e nada me faltará.  
Pensa Nele em todos os caminhos e Ele te conduzirá”.

## **OFEREÇO**

À minha mãe, **Vera**, pelo amor, pelo incentivo pela paciência,  
nome que sempre pronunciarei com orgulho;  
À minha irmã Juliana, e à minha madrinha Marisa Gianechini,  
pela atenção que me foi dada todos esses tempos.

## **DEDICO**

Ao meu PAI **Yrecê**, meu orgulho de viver, que tanto me incentivou, me apoiou,  
me deu forças e me fez enxergar que nada na vida é impossível.  
Se cheguei até aqui foi por sua causa! Por mais que faço por você nada irá ser  
comparável pelo que você fez por mim.  
Você foi e sempre irá ser meu porto seguro.  
Meu eterno agradecimento a você meu PAI. Amo você!

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, acima de tudo e de todos, pela saúde, pela misericórdia e pelo seu infinito amor...

Às Professoras Rita de Cassia Panizzi e Margarete Camargo pela paciência, pela força e principalmente pela compreensão e pelo apoio. Sem vocês não conseguiria chegar até aqui. Obrigada por tudo;

À Professora Mara Cristina Pessôa da Cruz pela atenção e disposição na execução das análises químicas;

Aos Professores que compõem a banca examinadora, pela valiosa contribuição;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida, possibilitando-me a realização do mestrado;

À Cooperativa de Agricultores da Região de Orlandia Ltda.- CAROL, por ter fornecido as sementes para o desenvolvimento do trabalho;

Às funcionárias Lúcia Rita Ramos e Rosangela Teodoro dos Santos, do Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Fitossanidade, pelo auxílio, amizade e dedicação;

Aos funcionários Luiz Carlos Rufino e Wanderley Penteado Brasil, pela ajuda, participação e, principalmente quando o experimento foi a campo;

Aos amigos do Departamento de Fitossanidade Carolina, Patrícia, Maria Isabel, Taís, Gabriela e Eliana;

Ao Prof. Dr. José Carlos Barbosa pela orientação na parte estatística do trabalho;

Ao bibliotecário Fábio Assispinho pela correção das bibliografias citadas.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
SUMMARY.....	v
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1. <i>Colletotrichum dematium</i> var. <i>truncata</i> , <i>Phomopsis sojæ</i> e <i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i> na cultura da soja.....	5
2.2. Teste de condutividade elétrica.....	8
2.3. Influência de fungos nos resultados do teste de vigor.....	13
2.4. Influência de fungos nos resultados do teste de Condutividade Elétrica .....	14
2.5. Técnica da restrição hídrica para inoculação de sementes com patógenos .....	15
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1. Local.....	18
3.2. Cultivares utilizadas.....	18
3.3. Obtenção dos isolados dos fungos.....	20
3.4. Inoculação das sementes com os fungos em laboratório .....	20
3.5. Teste de sanidade das sementes.....	22
3.6. Testes de vigor e composição química da água de embebição das sementes.....	22
3.6.1. Teste padrão de germinação.....	22
3.6.2. Índice de velocidade de emergência (IVE).....	23
3.6.3. Teste de envelhecimento acelerado (EA).....	24
3.6.4. Teste de frio (TF).....	24
3.6.5. Teste de condutividade elétrica (CE ).....	25
3.6.6. Composição química da água de embebição das sementes.....	25
3.7. Instalação do experimento em campo.....	26
3.7.1. Inoculação das plantas.....	26
3.7.2. Colheita.....	27
3.8. Avaliação da qualidade fisiológica e física das sementes de soja provenientes de plantas inoculadas em condições de campo.....	27
3.8.1. Teste de vigor e composição química da água de embebição das sementes.....	27
3.8.2. Teor de água.....	28
3.8.3. Peso de 1000 sementes.....	28
3.9. Análise estatística.....	28



IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1. Teste de sanidade de sementes da cultivar Embrapa 48.....	29
4.2. Testes de Vigor.....	30
4.2.1. Teste de Germinação.....	30
4.2.2. Índice de velocidade de emergência (IVE), teste de frio (TF) e envelhecimento acelerado (EA).....	32
4.2.3. Teste de Condutividade Elétrica.....	35
4.3. Composição química da água de embebição das sementes.....	37
4.4. Resultados obtidos nos testes realizados em sementes oriundas das plantas inoculadas no campo.....	39
4.4.1. Teste de sanidade e sementes.....	39
4.4.2. Testes de Vigor.....	41
4.4.2.1. Teste de germinação.....	41
4.4.2.2. Índice de velocidade de emergência (IVE), teste de frio (TF), envelhecimento acelerado (EA) e condutividade elétrica (CE).....	42
4.4.3. Composição química da água de embebição das sementes.....	45
4.4.4. Teor de água das sementes (TA).....	46
4.4.5. Peso de 1000 sementes.....	48
V. CONCLUSÃO.....	50
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

**INFLUÊNCIA DE *Colletotrichum dematium* var. *truncata*, *Phomopsis sojae*  
E *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* NOS TESTES DE VIGOR DE  
SEMENTES DE SOJA**

**RESUMO** – O emprego de procedimentos adequados para avaliar o vigor de sementes é fundamental dentro do programa de controle de qualidade de sementes. O objetivo dessa pesquisa foi verificar a influência dos fungos *Colletotrichum dematium* var. *truncata*, *Phomopsis sojae* e *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* na qualidade fisiológica de sementes de soja determinada pelo índice de velocidade de emergência (IVE), germinação (TG), teste de frio (TF) e condutividade elétrica (CE). A pesquisa foi realizada em condições de laboratório com a cultivar Embrapa 48 e em condições de campo com as cultivares Embrapa 48, Goiânia e Emgopa 313. Em condições de laboratório, as sementes foram inoculadas por sobreposição em meio de cultura BDA sem e com restrição hídrica (-1 Mpa, pelo uso de Manitol) com crescimento micelial dos fungos em estudo pelo período de 20 horas. Após a inoculação, as sementes foram secas naturalmente e realizaram-se os testes de sanidade e de vigor. Para a condutividade elétrica determinou-se também a concentração de Potássio (K), Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg) na água de embebição das sementes. Em condições de campo as plantas das cultivares Embrapa 48, Goiânia e Emgopa 313 foram inoculadas com os fungos a partir do florescimento por três vezes durante seu desenvolvimento. A colheita foi realizada separadamente para cada cultivar e cada tratamento. Foram realizados os mesmos testes feitos com as sementes inoculadas artificialmente. Pelos resultados encontrados no experimento de inoculação em laboratório verifica-se que o método de inoculação das sementes para a cultivar Embrapa 48 com os fungos em estudos foi eficiente, encontrando-se infecção de 50% para *Colletotrichum dematium* var. *truncata* e *Phomopsis sojae*, e, 25% para *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*. Todos os fungos

afetaram a germinação e o vigor das sementes, pelos índices de velocidade de emergência, teste de frio e envelhecimento acelerado. O uso do Manitol para restrição hídrica não alterou os resultados dos testes de vigor e nem a concentração de Ca e Mg na água de embebição das sementes utilizadas para leitura da condutividade elétrica. Nos resultados dos testes realizados com as sementes provenientes de plantas inoculadas no campo para cultivar Embrapa 48 observou-se o efeito dos fungos sobre o vigor das sementes somente no teste de Índice de velocidade de emergência, onde a porcentagem de sementes germinadas foi maior na testemunha. Para a cultivar Goiânia não houve diferença estatística no índice de velocidade de emergência de sementes na testemunha e nos tratamentos com inoculação. Na cultivar Emgopa 313 não observou-se interferência dos tratamentos no vigor das sementes pelo Índice de velocidade de emergência, teste frio e condutividade elétrica. *Phomopsis sojae* e *C. dematium* var. *truncata* influenciaram o vigor das sementes afetando a germinação no resultado do teste de envelhecimento acelerado. Com relação ao teste de condutividade elétrica verificou-se que as sementes provenientes de plantas inoculadas com os fungos apresentaram menor quantidade de lixiviado na água de embebição.

**Palavras-chave:** *Glycine max*; fungos; vigor.

**INFLUENCE OF *Colletotrichum dematium* var. *truncata*, *Phomopsis sojae* AND *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* IN THE VIGOR TEST FOR SOYBEEN SEEDS**

**SUMMARY** – The use of adequate procedures for evaluate the vigor of seeds is fundamental into the quality control of seeds. The objective of this research was to verify the influence of the fungi *Colletotrichum dematium* var. *truncata* and *Phomopsis sojae*, and, for *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* in the physiological quality of soybean seeds determined for the emergence speed index, germination, cold test and electrical conductivity test. The research was carried in laboratory conditions with cultivar Embrapa 48 and in field conditions with cultivars Embrapa 48, Goiânia and Emgopa 313. In laboratory conditions, the seeds had been inoculated by contact culture medium BDA without and with hydric restriction (-1 Mpa, using Manitol) with micelial growth fungi for the period of 20 hours. After the inoculation, the seeds had been droughts and the vigor and health tests were done. For the electrical conductivity the Potassium (K), Calcium (Ca) and Magnesium (Mg) concentration was also determined, in the water of imbibition of the seeds. In field conditions the plants of cultivars Embrapa 48, Goiânia and Emgopa 313 had been inoculated with the fungi from the bloom for three times during the plant growth. The harvest was carried through separately each to cultivate and each fungi inoculated. The same tests of the seeds inoculated artificially had been carried through. For the results in the inoculation in laboratory it as verified that the method of inoculation of the seeds with the fungi per contact was efficient, with infection of 50% for *Colletotrichum dematium* var. *truncata* and *Phomopsis sojae*, and 25%, for *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*. All the fungi had affected the germination and vigor of the seeds, for emergency speed index, the cold test and accelerated aging. The use of Manitol for hydric

restriction did not modify the results of the vigor tests and nor the concentration of Ca and Mg in the water of imbibition of the seeds used for. The results of tests with seeds from plant inoculation infield, in the test of vigor of cultivar Embrapa 48 the effect of the fungi was only observed in the seeds in emergency speed index, where the percentage of germinated seeds was bigger in control treatment for Goiânia cultivart did not have statistical differences emergence speed index of seeds from control and the other treatment. With relation to the electrical conductive test it was verified that the seeds from plants inoculated with the fungi had presented lower leached in the imbibition water.

**Keywords:** *Glycine max*; fungi; vigor.

## I. INTRODUÇÃO

A cultura da soja [*Glycine max* (L.) MERRIL] pode ser afetada no campo por um grande número de doenças fúngicas e algumas bacterianas, além de viroses e nematóides. As doenças causadas por fungos são consideradas muito importantes, não somente devido ao maior número, mas pelos prejuízos causados, tanto no rendimento quanto na qualidade da semente. Muitos desses microrganismos têm a semente como seu principal veículo de disseminação e de introdução em novas áreas de cultivo, onde sob condições favoráveis de ambiente poderão causar sérios danos à cultura (HENNING, 1996).

Entre as principais doenças fúngicas que ocorrem na cultura da soja estão a antracnose, causada por *Colletotrichum dematium* var. *truncata* e a seca da haste ou Phomopsis da semente, causada por *Phomopsis sojae*. *Colletotrichum dematium* var. *truncata* afeta a fase inicial de formação das vagens e *P. sojae* é o fungo que causa o maior descarte de lotes de sementes do cerrado (SCHNEIDER et al., 1974).

De grande importância no Brasil, a cultura da soja ocupa a segunda colocação na produção mundial. A utilização de sementes de alta qualidade é indispensável para a obtenção de maior rendimento por área (BRACCINI et al., 2003).

Nesse sentido as empresas produtoras de sementes têm buscado um aprimoramento técnico de suas atividades visando o aumento de produtividade, associado a um incremento na qualidade das sementes (VIEIRA, 1994). A tecnologia de sementes tem procurado aprimorar os testes de germinação e vigor com o objetivo de que os resultados expressem a real qualidade fisiológica de um determinado lote de sementes.

Entre os testes utilizados para a avaliação do vigor de sementes está o teste de condutividade elétrica, utilizado inicialmente na década de 20 para estimar a viabilidade de sementes (BARBEDO & CICERO, 1998). Mais tarde, a medida do teste da condutividade elétrica, realizada na solução de embebição de sementes passou a ser estudada como um teste de vigor para várias espécies, dentre as quais se encontra a soja (TAO, 1978; MARCOS FILHO et al., 1990, 1994; LOEFFLER et al., 1988, HAMPTON & TEKRONY, 1995).

MENTEN (1997) condicionou a diminuição e retardamento da emergência das plântulas de soja a baixas temperaturas do solo em regiões temperadas. CARVALHO (1994) acrescenta a esse fator, solo excessivamente úmido e a presença de microrganismo patogênicos, afirmando que o teste de frio avalia o efeito combinado desses fatores.

Apesar do teste de condutividade elétrica ter sido considerado um eficiente indicador da emergência de plântulas no campo, particularmente para sementes de ervilha e soja, o mesmo continua passando por refinamentos na metodologia para melhorar a eficiência na avaliação do vigor. Dentre esses refinamentos, a presença de patógenos na semente, especialmente fungos tem sido motivo de preocupação.

O objetivo do presente trabalho foi verificar se os fungos *Colletotrichum dematium* var. *truncata*, *Phomopsis sojae* e *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, patogênicos à cultura da soja e transportados via semente, influenciam os resultados dos testes de vigor e condutividade elétrica.

## II. REVISÃO DA LITERATURA

A cultura da soja no Brasil recebe grande atenção da pesquisa, principalmente visando a obtenção de informações que possibilitem aumentos na produtividade. Para conseguir maiores rendimentos por área, é indispensável, dentre as técnicas adequadas de cultivo, a utilização de sementes de alta qualidade, expressa pelos componentes genéticos, físicos e sanitários (BRACCINI et al., 2003).

A semente é um insumo indispensável na produção agrícola, desempenhando importante papel para o aumento quantitativo e qualitativo de produtividade. A utilização de lotes de alta qualidade é um fator preponderante para o sucesso de qualquer cultura (GASPAR & NAKAGAWA, 2002).

A principal finalidade da análise de sementes é a de estimar a qualidade de um lote para semeadura. A análise de sementes é ainda utilizada em trabalhos de pesquisa e na identificação de problemas de qualidade e suas causas. Assim, para a obtenção de sementes com um nível de qualidade proposto, é importante manter a produção sob controle e, dessa forma, a análise se constitui em instrumento imprescindível (NOVEMBRE, 2001).

A ocorrência de condições climáticas desfavoráveis para a cultura da soja, como chuvas e altas temperaturas durante as fases de maturação e colheita, afetam, além da qualidade fisiológica, a sanidade das sementes, pois podem propiciar aumento da infecção de sementes por fungos, como *Phomopsis* spp. e *Fusarium* spp. e, em conseqüência, reduzir a germinação (HENNING, 1996).



Segundo MACHADO (1998), entre os agentes patogênicos para plantas, os fungos são os mais ativos, tendo uma maior habilidade em penetrar diretamente nos tecidos vegetais e aí facilmente se alojarem. O inóculo pode ser transportado via semente, na forma de micélio e/ou de esporos, mas a taxa de transmissão do patógeno, entre outros fatores, depende fundamentalmente da quantidade e localização do inóculo na semente. A maior parte dos fungos patogênicos associados a soja tem nas sementes veículo de introdução em novas áreas de plantio onde, sob condições ambientais favoráveis, poderão causar sérios danos a cultura (FRANÇA NETO & HENNING, 1984).

Em muitos casos, a semente com baixa incidência de fungos germina quando semeada em condições ambientais favoráveis. No entanto, em ambiente adverso, a germinação é lenta e os fungos infectantes têm oportunidade de colonizar a semente e a plântula em desenvolvimento, ou mesmo podem causar a morte das mesmas após a semeadura (CASA et al., 1995). Isso ocorre devido a rapidez de desenvolvimento e a alta agressividade de certos patógenos latentes na semente, os quais retornam à atividade assim que encontram condições favoráveis, causando a morte antes que essa evidencie os primeiros indícios de germinação (MENTEN, 1991).

Fungos que atacam as sementes pertencem basicamente a duas categorias, os que atacam a cultura no campo e os de armazenamento. São saprófitas ou parasitas que podem tanto infectar sementes durante seu desenvolvimento, quanto atacar plântulas e plantas mais velhas. Fungos que atacam a cultura no campo geralmente permanecem quiescentes durante o armazenamento das sementes. Os fungos de armazenamento afetam as sementes armazenadas pois são capazes de se desenvolver sob condições relativamente secas onde os fungos que atacam a cultura no campo não conseguem crescer (CHRISTENSEN & KAUFMANN, 1965).

## **2.1. *Colletotrichum dematium* var. *truncata*, *Phomopsis sojae* e *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* na cultura da soja**

As sementes são importantes veículos de agentes fitopatogênicos, que podem ser levados ao campo e provocar redução na germinação e vigor, originando focos primários da doença. A maioria das doenças de importância econômica que ocorre na cultura da soja é causada por patógenos que são transportados pelas sementes, dentre os quais merecem destaque: *Colletotrichum dematium* var. *truncata* (agente causal da antracnose) e *Phomopsis* sp. (agente causal da seca da haste e da vagem da soja e da deterioração de sementes) (DRINGRA & ACUNÃ, 1997; GOULART, 1997).

A antracnose é a principal doença que afeta a fase inicial de formação das vagens e é um dos principais problemas nos cerrados. A maior ocorrência pode ser atribuída à elevada precipitação e as altas temperaturas e adensamento de semeadura. É causada pelo fungo *C. dematium* var. *truncata*, podendo ocorrer morte das plântulas, necrose dos pecíolos e manchas nas folhas, hastes e vagens. Inóculo proveniente de restos de cultura e sementes infectadas pode causar necrose nos cotilédones, que pode se estender para o hipocótilo, causando o damping-off de pré e pós-emergência. O fungo afeta a planta em qualquer estágio de desenvolvimento podendo causar queda total das vagens ou deterioração total das sementes em colheita retardada. As sementes apresentam manchas deprimidas, de coloração castanho-escuras, e nos estádios R3 e R4 adquirem coloração castanho escura à negra e ficam retorcidas (ALMEIDA et al., 2005).

A infecção das sementes por *C. dematium* var. *truncata* e *Phomopsis* sp. geralmente acontece através da parede da vagem. Apesar da infecção nas vagens ocorrer quando elas ainda encontram-se verdes, a infecção das sementes geralmente ocorre após o início da maturação da vagem. Acreditava-se que a infecção das sementes ocorresse através de

rachaduras do tegumento e da micrópila, porque a maioria dos fungos localizava-se no tegumento, embora *Phomopsis* spp. era encontrada no endosperma (SCHINEIDER et al., 1974; ILYAS et al., 1975). Entretanto, estudos histológicos têm demonstrado que os conídios de *Phomopsis longicolla* germinam e estabelecem-se dentro de 24 horas após sua chegada à superfície da vagem, ressaltando-se que, após 24 a 48 horas, ocorre a penetração nas vagens. As colonizações das sementes acontecem após a colonização da vagem (DRINGRA & ACUNÃ, 1997).

Em períodos de alta umidade, as partes infectadas da planta ficam cobertas por pontuações negras que são as frutificações do fungo *Phomopsis* sp. Os acérvulos são providos de setas escuras. Os conídios unicelulares e hialinos são produzidos em conidióforos, desenvolvendo-se de forma sistêmica no interior do tecido cortical e pode não se expressar até o final do ciclo dependendo das condições climáticas, da fertilidade e da densidade de semeadura (YORINORI et al., 1997). O fungo reduz a qualidade de sementes de soja podendo causar deterioração das sementes e morte das plântulas (TIFFANY, 1951).

De acordo com AGARWAL & SINCLAIR (1997) a transmissão de fungos é dependente da quantidade e localização do inóculo nas sementes, assim como das condições climáticas.

*Phomopsis sojæ* é responsável pela seca da haste da vagem, pelo descarte de lotes de sementes dos cerrados e é conhecida também como *Phomopsis* da semente. Seu maior dano é observado em anos chuvosos, nos estádios iniciais de formação das vagens e na maturação, quando ocorre o atraso da colheita por excesso de umidade (FRANÇA NETO & WEST, 1989).

O processo infeccioso é semelhante ao de *C. dematium* var. *truncata*. As vagens ficam chochas ou apodrecem, adquirem coloração esbranquiçada a castanho clara. Sob condições de alta umidade o fungo desenvolve frutificações negras, dispostas de forma linear. Sementes apresentam enrugamento e rachaduras do tegumento, ficam sem brilho e

cobertas com micélio de coloração esbranquiçada a bege. Sementes infectadas superficialmente por *Phomopsis sojae*, quando semeadas em solos úmidos, geralmente chegam a emergir, porém, o fungo desenvolvido no tegumento não permite que os cotilédones se abram, impedindo a expansão das folhas primárias. O fungo sobrevive como micélio dormente em restos de culturas ou sementes infectadas, podendo sobreviver na forma de picnídio e peritécios em restos de cultura. Somente infecções que se iniciam nas vagens resultam em deterioração das sementes (ALMEIDA et al., 2005).

O cancro da haste foi identificado pela primeira vez no Paraná em 1989, espalhando-se por todas regiões produtoras de soja do País. O desenvolvimento de variedades resistentes permite o cultivo de soja sem perdas com essa doença. O sintoma inicial é visível aos 15-20 dias após a infecção e é caracterizado por pequenos pontos negros que evoluem para manchas alongadas a elípticas e mudam da coloração negra para castanho avermelhada formando lesões alongadas, geralmente de um lado da haste. Plantas severamente infectadas sofrem quebra da haste e severo acamamento. Lavouras altamente infectadas podem ser em poucos dias totalmente dizimadas. Normalmente o nível de infecção das sementes é baixo. Uma das primeiras indicações de planta em fase adiantada de infecção é a presença de folhas amareladas e com necrose entre as nervuras, caracterizando a chamada folha “carijó” (YORINORI, 1997).

A fase imperfeita do fungo, com a produção de picnídios, ocorre nos tecidos infectados, mesmo antes da morte da planta. Esta fase é importante na contaminação dos restos culturais durante a entressafra, porém não deve contribuir para a ocorrência da doença na safra seguinte. A forma sexuada (*Diaporthe*) responsável pela doença na nova safra está presente desde o final do ciclo da cultura, na forma de peritécio em plantas mortas, em restos de culturas e durante a entre safra. Tanto os conídios como ascósporos são capazes de infectar a soja e são produzidos em abundância nas plantas mortas ou nos restos culturais. O cancro da haste

é uma doença de evolução lenta e as infecções ocorridas logo após a emergência das plântulas formam os cancrios entre os estádios de floração e de enchimento das vagens. As plantas adultas adquirem resistência à infecção e ao desenvolvimento da doença (ALMEIDA et al., 2005).

## **2.2. Teste de Condutividade Elétrica**

Existe um conjunto de técnicas utilizadas para avaliação do vigor de sementes, e entre essas se encontra o teste de condutividade elétrica.

Dentre os testes de vigor considerados mais importantes pela International Seed Testing Association, destaca-se o teste de condutividade elétrica como um dos indicados para estimar o vigor das sementes, devido sua objetividade e rapidez. Além da facilidade de execução na maioria dos laboratórios de análise de sementes, o teste de condutividade apresenta menores despesas em equipamento e treinamento de pessoal, de modo a permitir agilização das tomadas de decisões (DIAS et al., 1998; RODO et al., 1998; VIEIRA & KRZYZANOWSKI, 1999).

O valor da condutividade elétrica é função da quantidade de lixiviados na solução de embebição das sementes, a qual está diretamente relacionada com a integridade das membranas celulares, sendo que as membranas mal estruturadas e células danificadas estão geralmente associadas com o processo de deterioração das sementes e, portanto com sementes de baixo vigor (BEWELEY & BLACK, 1985).

Várias pesquisas sobre condutividade elétrica têm mostrado que podem ser lixiviados para a água de embebição das sementes, compostos orgânicos (açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, proteínas e substâncias fenólicas), fosfatos e íons  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$  e  $\text{Na}^+$  (MARCOS FILHO et al., 1982; BEWELEY & BLACK, 1985).

Vários fatores podem afetar os resultados do teste de condutividade elétrica. Dentre esses, podem se destacar o tamanho da semente, a

presença de sementes danificadas (TAO, 1978), a temperatura e o período de embebição (LOEFFLER et al., 1988), o teor de água inicial das sementes (LOEFFLER et al., 1988; VIEIRA et al., 1996), a duração do teste (MARCOS FILHO et al., 1990), a temperatura de armazenamento (FERGUSON, 1988; VIEIRA et al., 1994), o efeito da adubação fosfatada e potássica (NAKAGAWA, et al., 2001), o efeito da aplicação de manganês (MANN et al., 2002), a morfologia da testa e o potencial fisiológico das sementes.

A condutividade elétrica tem sido relatada como um teste bioquímico para avaliar o vigor (HAMPTON & TEKRONY, 1995), entretanto pode-se considerar que o mesmo encerra basicamente dois princípios: um físico, relacionando à avaliação da corrente elétrica, por meio de uma ponte de condutividade na solução de embebição, e um, biológico, que se refere à perda de lixiviados do interior da célula para o meio exterior, envolvendo processos bioquímicos relacionados à integridade das membranas celulares (VIEIRA, 1994; VIEIRA & KRZYZANOWSKI, 1999). Esse teste baseia-se no princípio de que o vigor está relacionado ao processo de deterioração, conseqüentemente à integridade do sistema de membrana celulares. Desse modo, quando as sementes são imersas em água durante o processo de embebição, ocorre a liberação de lixiviados do interior dessas para o meio líquido, em intensidade proporcional ao estado de desorganização em que se encontram as membranas celulares das sementes (WOODSTOCK, 1973; MARCOS FILHO et al., 1987; VIEIRA, 1994).

A relação entre o teor de água, o nível de organização das membranas celulares das sementes e a quantidade de lixiviados na solução de embebição é a base teórica que permite relacionar a condutividade elétrica com o vigor de sementes, em que altos valores de condutividade elétrica (alta perda de eletrólitos) indicam baixo vigor, e baixos valores (baixa perda de eletrólitos), alta qualidade fisiológicas das sementes, logo alto vigor (HAMPTON & TEKRONY, 1995; VIEIRA &

KRZYŻANOWSKI, 1999). Assim, o teste de condutividade elétrica tem sido indicado como procedimento para avaliar o vigor de sementes de soja (MARCOS FILHO et al., 1987; HAMPTON & TEKRONY, 1995; VIEIRA & KRZYŻANOWSKI, 1999; VIEIRA et al., 2001).

A causa da destruição do sistema de membranas seria a ação de grupos químicos altamente reativos denominados de radicais livres, os quais são formados pela oxidação de ácidos graxos insaturados (BEWLEY & BLACK, 1985). Essa desestruturação, segundo CARVALHO (1994), teria reflexos principalmente na capacidade da membrana em regular o fluxo de entrada e saída de água e de solutos. A extensão da desorganização das membranas celulares pode usualmente ser estimada pela magnitude dos solutos lixiviados de sementes embebidas em água.

Dentro do contexto de que o processo de deterioração da semente se inicia com a perda da integridade das membranas celulares, sementes com baixo vigor tendem a apresentar desorganização na estrutura dessas membranas, permitindo, quando do início da absorção de água por uma semente posta para germinar, um aumento na lixiviação de solutos fenólicos, e de íons inorgânicos: K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> e Na<sup>+</sup> (VIEIRA, 1994).

O teste de condutividade elétrica permite a identificação dos lotes de menor vigor que deverão ser armazenados sob condições mais favoráveis, e, durante a comercialização, serem encaminhados para regiões de menor possibilidade de estresses ambientais, ou para agricultores de melhor nível tecnológico (DIAS & MARCOS FILHO, 1995).

O aumento no valor da condutividade elétrica em função da diminuição do teor de água das sementes pode estar relacionado com o processo de reorganização da dupla camada lipídica da membrana celular, em função do processo de reidratação da semente. Quanto menor o teor de água da semente, maior o estado de desorganização da membrana celular, logo, maior o tempo necessário para que ocorra a reorganização dessa e conseqüentemente redução da lixiviação, quando comparada a sementes com maior teor de água ( BEWLEY & BLACK, 1985).

Uma outra hipótese para explicar a maior lixiviação de solutos nas sementes com menor teor de água é a possível ocorrência de dano por embebição. Os mecanismos de dano por embebição, assim como os por baixas temperaturas, têm sido considerados como injúria física às membranas, ou seja, como um bloqueio no sistema metabólico e, ainda, como uma combinação de injúria metabólica e física, possivelmente a nível molecular (POLLOCK, 1969).

ROSA et al. (2000) verificaram que em sementes de milho, quando imersas diretamente em água, sem passarem por qualquer processo de reidratação, os valores de condutividade elétrica foram notadamente maiores, indicando que houve perda de solutos devido ao próprio processo de embebição de água. A absorção de água pelas sementes com umidade inicial de 11% tem uma velocidade favorecida pelo gradiente de potencial hídrico entre o seu interior e a água circundante, não permitindo tempo hábil para que os sistemas de membranas recuperem sua característica semi-permeável; ocorre então uma grande perda de solutos, principalmente pelas sementes com sistema de membranas mais danificadas.

O efeito da temperatura sobre a embebição e lixiviados pode estar relacionado com alterações na viscosidade da água, interferindo tanto na quantidade como na velocidade de liberação dos exsudados (MARCHI & CÍCERO, 2002).

ALBUQUERQUE et al. (2001) verificaram que, em sementes de girassol, a temperatura de 30°C propiciou liberação de eletrólitos significativamente superior à temperatura de 25°C. Verificaram ainda que, com o aumento do período de embebição houve uma maior quantidade de eletrólitos liberados, sendo que, entre os períodos de 20 e 24 horas, não ocorreram diferenças significativas, e, após o período de 24 horas, os valores se estabilizaram.

O tempo de embebição das sementes é variável de acordo com a espécie. Normalmente, tem-se recomendado a avaliação da condutividade elétrica após um período de imersão de 24 horas para espécies de



sementes grandes, tais como ervilha (BRANDNOCK & MATTHEWS, 1970), milho (BRUGGINK et al., 1991), soja (DIAS & MARCOS FILHO, 1995) e sementes de ingá (BARBEDO & CÍCERO, 1998), para detecção de diferenças de vigor.

A redução do tempo de embebição é de grande importância para os programas de controle de qualidade de sementes onde se buscam informações sobre o vigor dos lotes em períodos de tempo relativamente curtos. Segundo VIEIRA & KRZYZANOWSKI (1999) em sementes pequenas é possível reduzir o período de embebição para o teste de condutividade elétrica. Tal fato foi verificado por GASPARI & NAKAGAWA (2002) em sementes de milho, onde nas duas horas de embebição ocorreu uma taxa de lixiviação que possibilitou a avaliação da condutividade elétrica da solução de embebição dessas e a diferenciação dos lotes. À semelhança do observado, DIAS et al. (1998) verificaram que em sementes de quiabo e de feijão-de-vagem o período de embebição para o teste de condutividade elétrica pode ser menor que o usualmente recomendado (24 horas), já que com quatro horas foi possível se obter uma indicação do lote de maior vigor.

Em amendoim, VANZOLINI & NAKAGAWA (1999) também verificaram que é possível reduzir o tempo de embebição das sementes para três horas e assim possibilitar o descarte de lotes de qualidade inferior, independente da temperatura de embebição.

KUO (1989) observou a existência de variabilidade na permeabilidade do tegumento entre genótipos de soja estudados, mostrando ser, o teste de condutividade elétrica, eficiente no monitoramento da diferença dessa permeabilidade. O mesmo foi observado por PANOBIANCO et al. (1997) em sementes de soja, por VIEIRA et al. (1996) em feijão, e VANZOLINI & NAKAGAWA (1998) em amendoim, confirmando a hipótese de ser a condutividade influenciada pelo genótipo testado. Também SÁ (1999) verificou diferenças nos resultados do teste de condutividade elétrica em genótipos diferentes de tomate (VIEIRA 1994).

Embora alguns autores recomendem o uso de sementes previamente selecionadas, ou seja, sem qualquer tipo de injúrias (MARCOS FILHO, 1987; KRZYZANOWSKI et al., 1991), devem-se levar em consideração os objetivos do trabalho a ser executado. No caso de realizar-se o teste de condutividade elétrica como um teste de rotina em um laboratório de análise de sementes, e que o teste esteja dentro de um sistema de controle de qualidade, não se justifica a escolha, visto que a sub-amostra utilizada não estaria representando o lote a ser testado. Nesse caso, devem-se utilizar sementes puras como para qualquer outro dos testes a ser realizado, como recomendado por LOEFFLER et al. (1988). Além do mais, esses mesmos autores verificaram que é impraticável e muito subjetivo identificar e selecionar, visualmente, sementes danificadas ou atacadas por algum fungo. Entretanto, sabe-se que sementes injuriadas causam aumentos significativos na condutividade elétrica de um determinado lote (TAO, 1978). Além de todos esses fatores inerentes à semente e ao método aplicado, NAKAGAWA et al. (2001) observaram, em sementes de aveia preta, que a adubação PK também contribuiu para elevar o teor desses elementos, com conseqüente aumento dos valores de condutividade elétrica, em decorrência do seu efeito sobre o teor desses elementos na composição químicas das sementes produzidas.

### **2.3. Influência de fungos nos resultados do teste de vigor**

MARCOS FILHO (1994) ressaltou que temperatura e umidade elevada podem inibir a manifestação de alguns microrganismos. Assim, os dados obtidos no teste de envelhecimento acelerado podem ser superiores aos observados no teste de germinação com as mesmas amostras. Portanto, as condições impostas pelo teste de envelhecimento artificial não agiram no comportamento das sementes, mas influenciaram na ação de microrganismos participantes da deterioração.

BALARDIN et al. (1992) detectaram o fungo *C. lindemuthianum* em amostras de sementes de feijoeiro dos municípios produtores do Estado de Santa Catarina e não observaram relação significativa entre a ocorrência desse e os parâmetros fisiológicos: poder germinativo e vigor, comportando-se as sementes apenas como fonte de inóculo e veículo para disseminação do patógeno, provavelmente por esse não ter atingido o embrião das sementes.

MENTEN (1997) observou relação inversa entre a incidência de microrganismos como *Phomopsis* sp. e *Coletotrichum lindemuthium* e os resultados dos testes fisiológicos como teste de envelhecimento acelerado e teste frio, em sementes de feijão.

#### **2.4. Influência de fungos nos resultados do teste de Condutividade Elétrica**

O teste de condutividade elétrica foi utilizado por LOFFLER et al. (1988) para avaliar a qualidade de sementes de soja. Os resultados mostraram que sementes com elevados níveis de *Phomopsis* sp. ou *Cercospora kikuchii*, com fissuras moderadas e severas no tegumento apresentaram liberação excessiva de eletrólitos, ao passo que as sementes altamente infectadas, porém com tegumento intacto, mostraram baixa condutividade e alto potencial de qualidade. Portanto, o efeito do fungo sobre o vigor não se evidencia quando as sementes se apresentam intactas, e sementes intactas não serão identificadas nestas condições.

Alguns fatores que interferem na condutividade elétrica não foram ainda suficientemente esclarecidos, sendo um desses a presença de patógenos nas sementes. Uma hipótese para a alteração no resultado no teste de condutividade elétrica seria que o fungo ao se desenvolver nas sementes, consumiria os nutrientes dessa, resultando em menor quantidade de eletrólitos presentes na água de embebição

Para se ter uma avaliação mais eficiente da qualidade da semente, é necessário determinar sua sanidade. No entanto, existem poucos relatos sobre a interferência de fungos associados às sementes nos testes de vigor comumente empregados nos laboratórios de análise de sementes (MENTEN, 1997).

Sementes de três cultivares de feijoeiro infectadas com o fungo *Macrophomina phaseolina*, apresentaram valores mais baixos de condutividade elétrica, quando comparadas às sementes sadias. Uma hipótese para tal fenômeno seria que o fungo, ao se desenvolver internamente nas sementes, consumiu nutrientes dessas, resultando em menor quantidade de eletrólitos presentes na água de embebição (NADALETO, 2004). PINTO (2005) também confirmou tal fato em sementes de feijoeiro.

## **2.5. Técnica da restrição hídrica para inoculação de sementes com patógenos**

Os prejuízos causados por fungos à cultura da soja têm exigido estudos mais pormenorizados das relações entre patógenos e hospedeiros. No entanto, pela dificuldade de obtenção de sementes com determinados níveis de infecção por esses patógenos, torna-se necessário a inoculação artificial desses em sementes. A técnica de restrição hídrica no substrato tem sido empregada como alternativa de inoculação, pois permite prolongar o período de permanência das sementes em contato com o patógeno, favorecendo assim maiores porcentagens de sementes infectadas, sem que as mesmas iniciem o processo de germinação. Assim, possibilita que as sementes, após a inoculação, tenham o seu período de utilização prolongado. Um fator importante na relação semente - patógeno é a água. O estabelecimento do conceito potencial químico da água permitiu a criação de uma linguagem comum e simples entre cientistas, capaz de expressar o comportamento físico da água no sistema solo-planta-

atmosfera. O movimento da água, tanto no estado líquido como o de vapor, é definido por um conceito único, expresso pelo potencial hídrico (CARVALHO, 1999).

De acordo com esse conceito, o potencial hídrico ( $\Psi$ ), expresso em unidades de energia ou pressão, corresponde à diferença entre potencial químico da água em um sistema, e o potencial químico da água pura, nas mesmas condições de pressão atmosférica e temperatura. O ajuste osmótico, é o fenômeno pelo qual as células ajustam-se a grandes mudanças no potencial osmótico do ambiente, através de uma regulação das quantidades de solutos osmoticamente compatíveis dentro das células (SALISBURY & ROSS, 1991). O acúmulo de solutos é encontrado em bactérias, fungos, plantas e animais, indicando que a maioria, ou todos os organismos, são capazes de ajustes osmóticos, até certo ponto (THOMAS et al., 1995).

As sementes durante o processo germinativo passam por três etapas fisiológicas. Na primeira ocorre uma rápida absorção de água, iniciando o processo de degradação de suas reservas. Na segunda etapa ocorre pequena variação no conteúdo de água das sementes, havendo transporte de substâncias metabolizadas na etapa anterior. A terceira etapa tem início quando a semente atinge teor de água alto o suficiente para que, nos tecidos meristemáticos, as células iniciem a divisão mitótica, o que leva ao crescimento do eixo embrionário (CARVALHO E NAKAGAWA, 1988). Em sementes de feijoeiro, por exemplo, o teor de água exigido para emissão da raiz primária, situa-se na faixa de 48 a 50% (SHIOGA, 1990).

Várias técnicas de controle de hidratação e germinação foram desenvolvidas. Dentre elas destaca-se o condicionamento fisiológico. Embora o método de infecção de sementes por fungos através de meios agarizados seja amplamente utilizado em todo o mundo, a adaptação da técnica de condicionamento osmótico vem conferir-lhe maior eficiência, pois essa técnica permite a utilização de períodos de inoculação mais longos sem que as sementes germinem sobre o meio e,

conseqüentemente, inviabilize seu posterior aproveitamento (COUTINHO, 2000).

Vários produtos já foram utilizados para o ajuste do potencial hídrico de substratos em estudos envolvendo o condicionamento osmótico de sementes de diferentes espécies. Entre estes, citam-se sais como  $MgSO_4$ ,  $NaCl$ ,  $MgCl_2$ ,  $K_3PO_4$ ,  $KH_2PO_4$ , glicerol, manitol e polietileno glicol (PILL, 1994).

### **III. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Local**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Análise de sementes do Departamento de Produção Vegetal, no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitossanidade e na área experimental do Departamento de Fitossanidade da UNESP- FCAV, Câmpus de Jaboticabal - SP.

#### **3.2. Cultivares utilizadas**

As sementes foram fornecidas pela CAROL - Cooperativa Nacional de Agricultores da Região de Orândia Ltda.

Foram utilizadas para a realização do trabalho, sementes de soja fiscalizadas das cultivares Embrapa 48, Goiânia e Emgopa 313. As características dos cultivares estão descritas na Tabela 1.

Durante a condução do experimento, as sementes foram mantidas em câmara fria, regulada a 10 °C, para a conservação da qualidade das mesmas.

Logo após as sementes serem trazidas da Carol- Ltda, foi realizado o teste de germinação, em areia e papel e o teste de sanidade. Os resultados dos testes encontram-se nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Antes da semeadura em campo foi realizado o teste de sanidade para verificar a incidência de fungos nas sementes.

Tabela 1- Características das cultivares de soja utilizadas

Características agronômicas	Emgopa 313	Embrapa 48	Goiânia
Ciclo	tardio	precoce	Semi-precoce
Habito de crescimento	determinado	determinado	determinado
Acamamento	resistente	resistente	resistente
Altura da planta (cm)	91 cm	63cm	74 cm
A M I P	18 cm	10 cm	18 cm
Cor da flor	branca	branca	roxa
Cor da pubescência	marrom	cinza	marrom
Cor do hilo	Marrom	Marrom clara	marrom
Reação ao cancro da haste	MR	MS	Resistente à campo
Semeadura	01/11 a 15/12	1/11 a 15/12	15/10 a 15/12
Recomendações	GO, DF,MS,MT,TO,MG	PR, SP, SC, MS	GO, MG, MT, BA E DF

MR: moderadamente resistente; MS: Moderadamente suscetível; AMIP:altura média de inserção das vagens. Dados coletados na Cooperativa Carol- Orlândia (SP).

Tabela 2. Teste de germinação realizado antes do plantio nas sementes das cultivares de soja: Goiânia, Embrapa 48 e Emgopa 313.

Cultivar	Germinação (%)	
	Papel	Areia
Goiânia	68,5	82,0
Embrapa 48	83,5	79,0
Emgopa313	60,5	80,0



Tabela 3. Teste de Sanidade das sementes pelo método de papel de filtro realizado antes da semeadura no campo nas cultivares de soja Goiânia, Embrapa 48 e Emgopa 313.

Cultivar	Embrapa 48		Goiânia		Embrapa 313	
	S/D	C/D	S/D	C/D	S/D	C/D
<i>Fusarium</i> sp.	5	2	6	1	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	33	-	10	6	12	-
<i>Rhizopus</i> sp.	10	9	-	-	-	-
<i>Curvularia</i> sp.	-	-	3	5	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.	-	-	-	-	6	5
<i>Epicoccum</i> sp.	11	-	-	-	10	-

S/D- sementes sem desinfestação superficial. C/D- Sementes com desinfestação superficial. Resultados originais expressos em porcentagem.

### 3.3. Obtenção dos isolados dos fungos

Os fungos utilizados para a realização dos experimentos foram *Phomopsis sojae*, *Colletotrichum dematium* var. *truncata* e *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* pertencentes à micoteca do Departamento de Fitossanidade de Jaboticabal, e são provenientes de sementes e restos vegetais de plantas de soja infectadas. Os fungos foram multiplicados em meio de cultura BDA (extrato de 200g de batata, 20 g de ágar, 20g de dextrose e 1000 mL de água destilada) e conservados em tubo de ensaio contendo suas colônias sobre o meio de cultura, cobertas por óleo mineral esterilizado.

### 3.4. Inoculação das sementes com os fungos em laboratório

Os fungos foram repicados para as placas de Petri contendo meio de cultura BDA e meio de cultura BDA acrescido do soluto manitol, potencial hídrico de - 1, 0 MPa. As concentrações dos solutos para o preparo dos

meios foram obtidas pela fórmula de Van't Hoff (SALYSBURY & ROSS, 1991):

Po= CIRT, onde:

Po= Potencial Osmótico (MPa);

C= Concentração (moles/ Kg de água);

I= Constante de Ionização;

R= Constante geral de gases (0, 00831x Kg x MPa x mol<sup>o</sup> x K<sup>o</sup> );

T= Temperatura absoluta (T<sup>o</sup> C + 273).

Foram utilizados discos de 0,5 cm de diâmetro repicados das bordas das colônias puras de cada fungo e transferidos para os meios, sendo utilizadas 10 placas para cada fungo em cada tratamento (BDA e BDA acrescido de manitol -1,0 MPa).

Sementes da cultivar Embrapa 48 foram utilizadas para esse experimento. Foram selecionadas e pesadas as sementes sem trincas, visíveis a olho nú e posteriormente desinfetadas com hipoclorito de sódio + água destilada (1:1), por 30 segundos, enxaguadas com água destilada autoclavada e secas à temperatura ambiente. Em seguida foram colocadas sobre folhas de papel de filtro esterilizadas. Para a inoculação as sementes foram distribuídas sobre colônias de cada fungo, desenvolvidas em placas de Petri com meio de cultura BDA e BDA acrescido de manitol (-1,0 MPa), em camada única e levemente prensadas sobre o meio, permanecendo assim por 20 horas.

Após esse período as sementes foram retiradas e mantidas em temperatura ambiente até atingirem seu peso inicial. As sementes foram mantidas por sete dias em câmara fria, antes da realização dos testes.

Os tratamentos utilizados foram: 1) testemunha - sementes sobre meio BDA; 2) testemunha - sementes sobre meio BDA+ manitol (-1,0MPa); 3) sementes colocadas sobre o fungo *P. sojae* desenvolvido em meio BDA; 4) sementes colocadas sobre o fungo *P. sojae* desenvolvido em meio BDA+ manitol (-1,0 MPa); 5) sementes colocadas sobre o fungo *D. phaseolorum* f. sp. *meridionalis* em meio BDA; 6) sementes colocadas sobre o fungo *D.*

*phaseolorum* f. sp. *meridionalis* em meio BDA + manitol (-1,0 MPa); 7) sementes colocadas sobre o fungo *C. dematium* var. *truncata* em meio BDA, e 8) sementes colocadas sobre o fungo *C. dematium* var. *truncata* em meio BDA + manitol (-1,0 MPa).

### **3.5. Teste de sanidade das sementes**

O teste de sanidade foi realizado pelo método do papel de filtro (LIMONARD, 1966).

As sementes foram colocadas eqüidistantes em placas de Petri (10 sementes por placa), sobre três folhas de papel de filtro embebidas em água destilada e, depois, levadas para câmara de incubação por sete dias a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  e luz branca alternada (12h luz / 12h escuro).

Para cada cultivar foram feitas 20 repetições de 10 sementes, totalizando 200 sementes.

Foram testados tratamentos com e sem desinfestação superficial das sementes. A desinfestação das sementes foi realizada pela imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% por três minutos. Após esse período as sementes foram plaqueadas e submetidas ao teste de sanidade.

Após o período de incubação, as sementes foram examinadas em microscópio estereoscópio, para identificação dos fungos.

### **3.6. Testes de vigor e composição química da água de embebição das sementes**

#### **3.6.1. Teste padrão de germinação**

O teste foi feito utilizando-se rolos de papel de germinação, previamente umedecidos com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o seu peso seco.

Foram utilizados quatro repetições de 50 sementes, semeadas nos rolos de papel de germinação e mantidas à temperatura de 25°C em câmara de germinação.

As contagens de sementes germinadas foram efetuadas aos cinco e oito dias após as sementeiras pelos critérios estabelecidos pelas Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 1992) e os dados obtidos foram expressos em porcentagens.

Para emergência em areia, foram empregadas quatro repetições de 50 sementes, tendo como substrato areia de textura média lavada. O teste foi realizado em sementes colhidas de plantas inoculadas em condições de campo e sementes inoculadas em laboratório.

A instalação do teste foi realizada em recipientes de plástico (23,5 x 14,0 x 10,5 cm), as sementes cobertas com camada de areia de aproximadamente 2 cm. Os recipientes foram mantidos à temperatura ambiente (25°C- 30°C), com regas periódicas sempre que necessário.

### **3.6.2. Índice de velocidade de emergência (IVE)**

A determinação do índice de velocidade de germinação das sementes de cada cultivar de soja foi realizado juntamente com o teste de padrão de germinação em areia.

As plântulas normais foram diariamente contadas até a estabilização do seu número (NAKAGAWA,1999).

Ao final do teste, com os dados diários do número de plântulas normais foi calculado o índice de germinação, segundo MAGUIRE (1962), pela fórmula:

$$IVG = G1/ N1+G2/N2...+ Gn/ Nn$$

Onde:

IVG = índice de velocidade de germinação

G1, G2, = números de plântulas normais contados na 1, 2 e última contagem respectivamente.

N1,N2, Nn = números de dias da semeadura à 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e última contagem, respectivamente.

### **3.6.3. Teste de envelhecimento acelerado (E A)**

Para a realização do teste de envelhecimento acelerado, foram utilizadas 8 subamostras de 50 sementes (aproximadamente 42 g) para cada cultivar de soja.

As sementes foram colocadas sobre uma tela de arame perfurada, acondicionadas em caixa do tipo gerbox (MARCOS FILHO, 1987). Em seguida foram adicionados 40 mL de água destiladas no fundo das caixas e então, estas foram tampadas e colocadas em câmara de envelhecimento por 48h à temperatura de 42°C e umidade relativa de 100%. Após esse período as sementes foram retiradas da câmara de envelhecimento e submetidas ao teste de germinação em areia e avaliação do teor de água das sementes (BITTENCOURT & VIEIRA, 1997).

Os resultados foram expressos em porcentagens de plântulas normais, contadas no quinto dia após a instalação do teste de germinação.

### **3.6.4. Teste de frio (TF)**

Foi adotado o método do teste de frio com solo, utilizando-se como substrato uma mistura de 2/3 de areia e 1/3 de solo de área de cultivo de soja. Foram feitas quatro repetições de 50 sementes para cada cultivar.

O substrato foi colocado em caixas plásticas com dimensões de 26 cm x 16 cm x 8,5cm.

As sementes foram colocadas em orifícios rasos, previamente perfurados sobre o substrato com marcador e então foram cobertas com

uma camada de aproximadamente 3 cm do mesmo substrato e umedecidas.

As caixas foram tampadas e acondicionadas em câmara fria, regulada à temperatura de 10 °C, onde permaneceram por sete dias.

Após esse período, as caixas foram retiradas da câmara fria e mantidas em temperatura ambiente (25 °C a 30 °C) por cinco dias, quando foi realizado a contagem do número de plântulas normais.

### **3.6.5. Teste de condutividade elétrica (CE )**

Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes. Cada repetição foi pesada com a precisão de duas casas decimais. A seguir, foram colocadas para embeber num recipiente contendo 75mL de água desionizada e então foram mantidas em um germinador à temperatura de 25°C , durante 24 horas. No final deste período, foram efetuadas leituras da solução contendo os eletrólitos lixiviados das sementes, em um aparelho condutivímetro DIGIMED, modelo CD21 com eletrodo constante 1,0 sendo os resultados foram expressos em  $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  de sementes (VIEIRA & KRZYZANOWSKI, 1999) pela fórmula:

$$\text{Condutividade} = \frac{\text{Condutividade lida}}{\text{Peso( 50 Sementes )}}$$

### **3.6.6. Composição química da água de embebição das sementes**

Após a leitura da condutividade elétrica, as sementes juntamente com a solução foram vertidas em recipiente, com auxílio de um funil, utilizando papel de filtro “Whatman” número 1.

Os recipientes foram fechados e retornados à temperatura de 25°C. Determinou-se os teores de potássio pelo método de fotometria de chama, e de cálcio e magnésio pelo método de espectrometria de absorção

atômica (BATAGLIA et al., 1983). Os valores foram expressos em mg do íon por Kg de sementes.

### **3.7. Instalação do experimento em campo**

As sementes das cultivares de soja Embrapa 48, Goiânia e Emgopa313 foram semeadas manualmente no campo em 24 de janeiro de 2006. As mesmas foram distribuídas em 4 parcelas constituídas de 6 linhas de 10m de comprimento, espaçadas de 0,45m, totalizando uma área de 113 m<sup>2</sup>.

Os tratamentos utilizados foram: testemunha, que não recebeu inoculação; inoculação com *C. dematium* var. *truncata*; inoculação com o fungo *P. sojae*; inoculação com o fungo *D. phaseolorum* f. sp. *meridionalis*.

Utilizou-se 250 sementes em 10m de linha para cada tratamento, os mesmos foram separados a uma distância de 7 metros, para evitar a interferência entre tratamentos. As parcelas foram mantidas livres de plantas daninhas e invasoras, com a utilização de herbicida (Roundap).

Foram utilizados os produtos químicos: Tamaron (Metamidofos- 800 litros de calda / ha nos dias 17/02; 24/02; 06/03; 16/03) e Folicur contra Míldio e Ferrugem (Tebuconazole- 800IL/ha). Todas as aplicações foram efetuadas com o auxílio de um pulverizador manual.

#### **3.7.1. Inoculação das plantas**

As suspensões de conídios, para aplicação em plantas no campo, foram obtidas adicionando-se água destilada nas placas contendo o fungo. A mesma foi filtrada com o auxílio de uma gaze para eliminar resíduos do meio de cultura e fragmentos maiores do micélio do fungo.

Na suspensão foi adicionado água destilada com duas gotas de espalhante adesivo Tween 80 até atingir o volume de 4 litros.

As plantas foram inoculadas pela pulverização na parte aérea da planta utilizando a suspensão de  $10^5$  conídios/mL, valor obtido através da câmara de Newbawer, utilizando-se pulverizador manual, a partir do final do florescimento e início do aparecimento das vagens. Foram realizadas três inoculações nos dias 19/04, 25/04 e 10/05 sobre as plantas no campo.

### **3.7.2. Colheita**

A colheita foi realizada manualmente na área útil (4 linhas centrais) de cada parcela, para cada tratamento em épocas diferentes, de acordo com as características de cada cultivar, devido ao período de floração ser diferente, ou seja, quando a cultivar atingiu o estágio R8 (95% das vagens com a cor da vagem madura).

As vagens foram debulhadas e peneiradas. As sementes foram colocadas em sacos de papel e guardadas em câmara fria.

### **3.8. Avaliação da qualidade fisiológica e física das sementes de soja provenientes de plantas inoculadas em condições de campo.**

As sementes obtidas de plantas inoculadas e não inoculadas no ensaio em condições de campo foram submetidas às seguintes análises:

#### **3.8.1. Testes de vigor e composição química da água de embebição das sementes**

Foram realizados os testes de germinação (TG), índice de velocidade de emergência (IVE), envelhecimento acelerado (EA), teste de frio (TF), condutividade elétrica (CE), composição química da solução de embebição, conforme descrito nos itens 3.6.1, 3.6.2, 3.6.3, 3.6.4, 3.6.5 e 3.6.6.



### 3.8.2. Teor de água

Antes e após o envelhecimento acelerado foi determinado o teor de água das sementes pelo método estufa para todas as variedades utilizando duas repetições de 25 sementes cada uma. Essas sementes foram pesadas em balança com precisão de 0,01g e assim foi obtido o peso úmido das amostras. Em seguida foram colocadas para secar em estufa a  $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , durante 24h (BRASIL, 1992). Após esse período efetuou-se uma nova pesagem, onde foi obtido o peso seco das sementes.

### 3.8.3. Peso de 1000 sementes

O peso de 1000 semente foi determinado utilizando-se oito repetições de 100 sementes, conforme metodologia descrita para a análise de sementes (BRASIL, 1992). Os resultados foram expressos em gramas.

## 3.9. Análise estatística

Os testes realizados com as sementes provenientes de plantas inoculadas no campo foram instalados em delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos a análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

No experimento em laboratório, de inoculação das sementes da cultivar Embrapa 48 foi também utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 ( testemunha, inoculação com *C. dematium* var. *truncata*, com *Phomopsis sojae* e *Diaporthe phaseolum* f. sp. *meridionalis*) x 2 ( meios de cultura BDA e BDA + manitol). Os dados foram submetidos a análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

## IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes realizados em sementes de soja na cultivar Embrapa 48, inoculada artificialmente com os fungos *C. dematium* var. *truncata*, *P. sojae* e *D. phaseolorum* f. sp. *meridionalis* são apresentados a seguir.

### 4.1. Teste de sanidade de sementes da cultivar Embrapa 48

Os resultados do teste de sanidade das sementes, após 20 horas de contato com os fungos, estão descritos na Tabela 4.

Verifica-se que a incidência de *C. dematium* var. *truncata* no interior das sementes foi de 50% e de *P. sojae* de 53% para meio de cultura sem manitol.

Para *D. phaseolorum* f. sp. *meridionalis* a incidência no interior das sementes foi de 25% em meio sem restrição hídrica e, de 49%, em meio acrescido de manitol.

A alta incidência dos fungos em estudo nas sementes inoculadas evidência eficiência do método de inoculação utilizado.

De uma maneira geral o uso de manitol (restrição hídrica) não afetou a inoculação de fungos nas sementes.

FRIGERI (2007) estudando a eficiência da inoculação em sementes de feijoeiro com os fungos *Colletotrichum truncata*, *C. lindemuthianum* e *Macrophomina phaseolina*, verificou que o tratamento que proporcionou maior infecção das sementes foi aquele em que essas foram incubadas em meio de cultura BDA sem restrição hídrica embora não tenha diferido das sementes que foram incubadas no meio com restrição hídrica.

Em sementes de algodão inoculadas por contato com o fungo *Colletotrichum cephalosporioides*, entre 12 até 48 horas resultou em infecção, decorrente da penetração do fungo no tegumento da semente.

O autor ressalta que períodos menores que 12 horas de contato corre-se o risco de não haver penetração do fungo a nível satisfatório e em quantidade suficiente para levar a um comprometimento da germinação (TANAKA et al.,1989).

Resultados obtidos por outros pesquisadores em meios de cultura com potenciais osmóticos entre -0,3 e -2,0 MPa estimularam o crescimento micelial dos fungos *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Cryphonectria parasítica*, *Fusarium moniliforme*, e *Colletotrichum lindemuthianum*, enquanto meios de cultura mais negativos que -2,0 MPa reduziram o crescimento micelial desses fungos (ADEBAYO & HARRIS, 1971; SUBBARAO & MICHAILIDES, 1993; GAO & SHAIN, 1995; CARVALHO, 1999).

## **4.2. Testes de vigor**

### **4.2.1. Teste de Germinação**

Observando-se os dados obtidos na Tabela 5 verifica-se que o tratamento testemunha (sementes não inoculadas com fungo) apresentou melhor germinação tanto no método do rolo de papel como no de areia, diferindo significativamente dos tratamentos onde houve inoculação das sementes com fungos. Esses dados concordam com os dados encontrados por YORINORI (1997) que constatou que a incidência de fungos em sementes de soja reduziu sua germinação.

Segundo CARVALHO (1998) vários trabalhos evidenciam que os fungos transmitidos pelas sementes são responsáveis pela redução da germinação dessas, bem como de sua emergência em campo.

Tabela 4. Teste de sanidade em sementes de soja da cultivar Embrapa 48 após 20 horas de inoculação artificial sobre os fungos *Colletotrichum dematium* var. *truncata*, *Phomopsis sojae* e *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*.

Tratamentos	Testemunha				<i>C. dematium</i> var. <i>truncata</i>				<i>P. sojae</i>				<i>D. p. f. sp. meridionalis</i>			
	BDA		BDA+M		BDA		BDA+M		BDA		BDA+M		BDA		BDA+M	
	C/D	S/D	C/D	S/D	C/D	S/D	C/D	S/D	S/D	C/D	C/D	S/D	C/D	S/D	C/D	S/D
<i>C. d. var. truncata</i>	-	-	-	-	50	55	50	45	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. sojae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	53	50	40	43	-	-	-	-
<i>D. p. f. sp. meridionalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25	30	49	43

Dados originais expressos em porcentagens (%). BDA- meio de cultura batata dextrose e ágar, e BDA+M- meio de cultura acrescido de manitol a uma concentração de -1,0 MPa. C/D- sementes com desinfestação superficial S/D- sementes sem desinfestação superficial.

Para germinação das sementes em areia não houve diferença significativa entre os fungos *C. dematium* var. *truncata*, *P. sojae* e *D. phaseolorum* f. sp. *meridionalis*. Na germinação em rolo de papel o fungo *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* causou maior decréscimo na germinação das sementes embora não tenha diferido de *P. sojae*, que por sua vez também não diferiu de *C. dematium* var. *truncata*. Esses dados concordam com BIZETTO & HOMECHIN (1997) que avaliaram a germinação de sementes de soja com altos índices de *Phomopsis* sp. e, concluíram que para emergência em areia, o número de plântulas normais foi superior ao teste padrão de germinação no laboratório.

No método do rolo de papel não houve diferença significativa entre os substratos onde as sementes foram colocadas (meios BDA e BDA+MANITOL) na germinação das sementes provavelmente devido à umidade da folha de papel onde as sementes foram colocadas ter anulado o efeito da restrição hídrica no meio de cultura (Tabela 5).

No método de areia, o uso de manitol para restrição hídrica proporcionou queda significativa na germinação das sementes, provavelmente devido ao menor teor de água, fato esse muito importante no processo de germinação.

#### **4.2.2. Índice de velocidade de emergência (IVE), teste de frio (TF) e envelhecimento acelerado (EA).**

Os resultados dos testes de índice de velocidade de emergência, teste de frio, envelhecimento acelerado, podem ser conferidos na Tabela 6.

*Colletotrichum dematium* var. *truncata* inoculado artificialmente, foi o fungo que causou maior influência no índice de velocidade de emergência afetando o vigor das sementes, embora não tenha diferido significativamente de *P. sojae* que por sua vez também não diferiu de *D. phaseolorum* f. sp. *meridionalis*. Para o parâmetro índice de velocidade de emergência de

sementes inoculadas com o fungo *D. phaseolorum* f. sp. *meridionalis* não diferenciou significativamente das sementes não inoculadas (Tabela 6).

Tabela 5. Interferência dos fungos *Colletotrichum dematium* var. *truncata*, *Phomopsis sojae* e *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, cultivados em BDA com e sem restrição hídrica, nos resultados do teste de germinação em rolo de papel e areia em sementes de soja cultivar Embrapa 48 inoculadas artificialmente.

Tratamentos	Germinação			
	Papel		Areia	
Testemunha	66,60 <sup>1</sup> a	84,1 <sup>2</sup>	67,58 <sup>1</sup> a	85,3 <sup>2</sup>
<i>C. dematium</i> var. <i>truncata</i>	53,23 b	64,1	55,38 b	67,6
<i>P. sojae</i>	51,88 bc	61,9	55,16 b	67,3
<i>D. p. f. sp. meridionalis</i>	49,18 c	57,2	53,79 b	65,0
Teste F	100,82**	—	34,20**	—
D.M.S.	3,02	—	4,29	—
Meios	—	—	—	—
BDA	54,91 <sup>1</sup> a	66,3 <sup>2</sup>	59,34 <sup>1</sup> a	73,4 <sup>2</sup>
BDA+M	55,53 a	67,4	56,32 b	69,2
Teste F	0,63 ns	—	6,08*	—
D.M.S.	1,60	—	2,27	—
Interação PXM	1,04 ns	—	0,63 ns	—
CV(%)	3,96	—	5,37	—

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,01$ ); CV(%) = coeficiente de variação; (1) Dados transformados em arco seno  $\sqrt{P/100}$ ; (2) Dados originais expressos em porcentagem; \* Significativo a 5% de probabilidade; \*\* Significativo a 1% de probabilidade; P- Patógeno; M- meios; BDA- meio de cultura batata, dextrose e ágar; BDA- meio de cultura batata, dextrose e ágar adicionado com manitol à concentração de -1,0 MPa

FRIGERI (2007) verificou no teste de índice de velocidade de emergência, que sementes de feijão inoculadas com *Macrophomina phaseolina*, *C. dematium* f. *truncata* e *C. lindemuthianum* foram estatisticamente iguais às sementes não inoculadas, independente do meio de cultura onde o fungo foi cultivado (com e sem restrição hídrica).

O uso da restrição hídrica em meio de cultura para inoculação artificial das sementes com os fungos em estudo, não afetou os resultados dos testes de Índice de velocidade de emergência e envelhecimento acelerado, porém o mesmo não ocorreu para o teste de frio.

Esses resultados concordam com os encontrados por TASSI (2007), que verificou que em sementes de soja da cultivar Embrapa 48 inoculadas com o fungo *C. dematium* var. *truncata*, desenvolvidos em meio de cultura a uma concentração de -1, MPa, não houve diferença estatística em relação às sementes não inoculadas. Mostrando mais uma vez que dependendo do tempo

Tabela 6. Interferência dos fungos *Colletotrichum dematium* var. *truncata*, *Phomopsis sojae* e *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, cultivados em BDA com e sem restrição hídrica, nos resultados do índice de velocidade de emergência (IVE), teste de frio (TF), envelhecimento acelerado (EA), em sementes de soja da cultivar Embrapa 48 inoculadas artificialmente.

Patógeno	IVE	TF	EA		
Testemunha	46,60 <sup>2</sup> a	69,18 <sup>1</sup> a	86,9 <sup>2</sup>	72,34 <sup>1</sup> a	90,6 <sup>2</sup>
<i>C. dematium</i> var. <i>truncata</i>	40,02 c	57,84 b	71,6	61,18 b	76,6
<i>Phomopsis sojae</i>	41,98 bc	53,74 b	64,9	64,86 b	81,9
<i>D. p. f. sp. meridionalis</i>	43,74 ab	54,18 b	65,5	64,84 b	81,8
Teste F	9,94**	36,43**	—	23,97**	—
D.M.S. (Tukey)	3,45	4,65	—	3,73	—
Meios	—	—	—	—	—
BDA	43,99 a	60,90 a	75,5	65,67 a	82,6
BDA+M	42,19 a	56,58 b	68,9	65,94 a	82,8
Teste F	4,13 ns	13,11**	—	0,08 ns	—
D.M.S. (Tukey)	1,83	2,46	—	1,98	—
Interação PXM	0,99 ns	2,68 ns	—	2,23 ns	—
CV(%)	5,82	5,75	—	4,12	—

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,01$ ); CV = coeficiente de variação; (1) Dados transformados em arco seno  $\sqrt{P/100}$ ; (2) Dados originais expressos em porcentagem; \* Significativo a 5% de probabilidade; \*\* Significativo a 1% de probabilidade; P- Patógeno; M- meios; BDA- meio de cultura batata, dextrose e ágar; BDA+M- meio de cultura batata, dextrose e ágar adicionado com manitol à concentração de -1,0 Mpa.

de exposição das sementes ao meio de cultura não é necessário o uso de manitol.

Pelo teste de envelhecimento acelerado verifica-se que os fungos *C. dematium* var. *truncata*, *P. sojae* e *D. phaseolorum* f. sp. *meridionalis* afetaram significativamente o vigor das sementes pois, houve diferença estatística com relação às sementes não inoculadas. Não ocorreu diferença estatística entre os fungos em estudo com relação à porcentagem de sementes germinadas.

No teste de frio (TF) todos os fungos influenciaram de forma negativa a germinação das sementes da cultivar Embrapa 48, e não houve diferença significativa entre eles. Não houve interação significativa entre patógenos e meio de cultura utilizado.

FRIGERI (2007), trabalhando com as cultivares de Feijão Carioca e FT Nobre, verificou que os fungos *Macrophomina phaseolina* e *C. dematium* var. *truncata* também afetaram a germinação das sementes envelhecidas artificialmente. Quanto ao meio de cultura não verificou diferença estatística em relação ao uso de manitol para restrição hídrica.

#### **4.2.3. Teste de condutividade elétrica**

Observando os dados contidos na Tabela 7 verifica-se que para sementes inoculadas artificialmente por contato com os fungos em meio de cultura BDA sem restrição hídrica, houve diferença significativa no resultado da condutividade elétrica entre sementes sadias e inoculadas, porém não houve, entre as sementes inoculadas para cada fungo em estudo. As sementes inoculadas com os fungos apresentaram maior lixiviação de eletrólitos na água de embebição o que sugere ter menor vigor. Resultado semelhante foi encontrado para sementes inoculadas artificialmente por contato com os fungos em meio de cultura BDA com restrição hídrica.

Esses resultados diferem dos encontrados por RAMOS (2005), que não verificou diferenças em vigor, no teste de condutividade elétrica, em sementes de milho sadias e infectadas por *Fusarium gramineum*.



De uma maneira geral o uso de manitol para restrição hídrica em meio de cultura não influenciou os resultados do teste de condutividade elétrica.

Segundo FRIGERI (2007), os valores de condutividade elétrica da água de embebição para sementes de feijão de duas cultivares inoculadas de *Colletotrichum truncata* e *C. lindemuthianum*, não foram alterados quando comparados com a água de embebição de sementes saudas.

TASSI (2007), observou que em sementes da cultivar Embrapa 48 inoculadas com *C. dematium* var. *truncata*, e *Phomopsis sojae*, com o uso da restrição hídrica à uma concentração de -1,0 MPa, diferiram estatisticamente da testemunha no teste de condutividade elétrica.

Tabela 7. Interferência dos fungos *Colletotrichum dematium* var. *truncata*, *Phomopsis sojae* e *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* cultivados em BDA com e sem restrição hídrica, nos resultados da Condutividade elétrica (CE) em sementes de soja da cultivar Embrapa 48 inoculadas artificialmente.

	BDA	BDA+M	Média
Testemunha	52,89 b B	71,05 b A	61,97 b
<i>C. dematium</i> var. <i>truncata</i>	88,80 a A	80,85 ab A	84,83 a
<i>P. sojae</i>	88,05 a A	89,27 a A	88,66 a
<i>D. p. f. sp. meridionalis</i>	89,24 a A	89,57 a A	89,40 a
Média	79,74 A	82,68 A	—

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ); BDA- meio de cultura batata dextrose e ágar e BDA+M- meio de cultura acrescido de manitol à uma concentração de -1,0 MPa. Coeficiente da variação(%) - 6,99; D.M.S para meio de cultura- 4,14 e para patógenos: 7,82; D.M.S para patógeno dentro de meio- 8,28, e D.M.S para meio dentro de patógeno- 11,07. F para patógeno- 41,89\*\* (\*\*: significativo a 1% de probabilidade) e para meio- 2,15 ns (ns: não significativo); Interação (Patógeno x meio)- 7,45\*\*; CE- Dados expressos em  $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ .

### 4.3. Composição química da água de embebição das sementes

Uma porção significativa dos eletrólitos liberados pelas sementes durante a embebição é representada por vários íons inorgânicos, dentre esses destacam-se o potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg). Em virtude desse fato analisou-se a concentração de íons na solução de embebição das sementes do teste de condutividade elétrica.

Observando os dados obtidos na Tabela 8 verifica-se que de uma maneira geral que o uso de manitol no meio de cultura (restrição hídrica), onde os fungos foram cultivados e inoculados nas sementes, não interferiu na quantidade de Ca e Mg lixiviados para a água de embebição das sementes. O mesmo não ocorreu em relação ao K que foi detectado em maior quantidade no lixiviado da água de embebição das sementes inoculadas com os fungos cultivados em meio de cultura acrescido de manitol.

Quando se compara a perda de K lixiviado verifica-se que a água de embebição das sementes inoculadas com *D. phaseolorum* f. sp. *meridionalis* apresentou maior quantidade do elemento; os demais tratamentos não diferenciaram entre si indicando vigor semelhantes o que não é real, pois no teste de germinação (Tabela 5) verifica-se que os fungos *C. dematium* var. *truncata*, *P. sojae* e *D. phaseolorum* f. sp. *meridionalis* afetaram a porcentagem de plantas germinadas. Isso indica não ser um bom parâmetro para se avaliar o vigor das sementes.

Para Cálcio verificou-se que na água de embebição das sementes saudas e inoculadas com *P. sojae*, a concentração desse elemento não diferiu significativamente e foi menor para sementes inoculadas com *C. dematium* var. *truncata* e *D. phaseolorum* f. sp. *meridionalis* que também não diferiram entre si.

Magnésio também foi encontrado em maior quantidade na água de embebição das sementes inoculadas com *D. phaseolorum* f. sp. *meridionalis*. A concentração do íon foi semelhante na água de embebição das sementes inoculadas com *C. dematium* var. *truncata* e sementes saudas.

Tabela 8. Efeito de *Colletotrichum dematium* var. *truncata*, *Phomopsis sojae* e *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* na concentração de K, Ca e Mg na água de embebição de sementes da cultivar Embrapa 48 inoculadas por contato com o fungo cultivado em BDA e BDA acrescido de manitol.

	K			Ca			Mg		
	BDA	BDA+M	Média	BDA	BDA+M	Média	BDA	BDA+M	Média
Testemunha	1401,00 b B	1742,50 b A	1751,75 b	75,25 b A	53,00 c B	64,13 c	68,25 b A	72,25 a A	70,25 b
<i>C. dematium</i> var. <i>truncata</i>	1549,00 ab A	1541,50 b A	1545,25 b	77,75 b A	84,00 ab A	88,88 b	70,25 b A	73,50 a A	71,88 b
<i>Phomopsis sojae</i>	1634,75 ab A	1681,50 b A	1658,13 b	61,75 b A	68,75 bc A	65,25 c	46,00 c A	52,50 b A	49,25 c
<i>D. p. f. sp. meridionalis</i>	1753,00 a B	2023,00a A	1888,00 a	99,50 a A	100,75 a A	100,13 a	101,50 a A	84,255 a B	92,88 a
Média	1584,44 B	1747,13 A	-	78,56 A	76,63 A	-	71,50 A	70,63 A	-
C V(%)	7,59	-	-	12,21	-	-	11,04	-	-
D.M.S. (Fator meio)	92,27	-	-	6,92	-	-	5,72	-	-
D.M.S. (Fator patógeno)	174,28	-	-	13,07	-	-	10,81	-	-
D.M.S. (meio x patógeno)	184,53	-	-	-	-	-	-	-	-
D.M.S. (patógeno x meio)	246,47	-	-	-	-	-	-	-	-
F (meio)	13,25**	-	-	0,33 ns	-	-	0,10 ns	-	-
F (patógeno))	12,15**	-	-	25,31**	-	-	41,32**	-	-
Interação P X MEIO	3,58*	-	-	4,23*	-	-	3,94*	-	-

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P>0,05$ ); BDA- meio de cultura batata dextrose e ágar e BDA+M- meio de cultura acrescido de manitol à uma concentração de -1,0 MPa.\*\*: significativo a 1% de probabilidade ; \*: significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; ns- não significativo.P- patógeno ; M- meio de cultura.

#### 4.4. Resultados obtidos nos testes realizados em sementes oriundas de plantas inoculadas no campo

##### 4.4.1. Teste de Sanidade de Sementes

O resultado dos testes de sanidade realizado nas sementes oriundas das plantas inoculadas com os fungos *C. dematium* var. *truncata*, *P. sojae* e *D. phaseolorum* f. sp. *meridionalis* no campo nas cultivares Embrapa 48, Goiânia e Emgopa 313 estão contidos na Tabela 9.

Verifica-se que a inoculação das plantas no campo com os fungos *C. dematium* var. *truncata*; *P. sojae* e *D. phaseolorum* f. sp. *meridionalis* resultou, em cada tratamento, em incidência daquele fungo nas sementes.

Para a cultivar Embrapa 48 a porcentagem de sementes infectadas no tratamento *C. dematium* var. *truncata* foi de 55% de sementes infectadas; para *P. sojae* foi de 43% e 18% para *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*.

Na cultivar Goiânia, para o tratamento *C. dematium* var. *truncata* a porcentagem de sementes infectadas com esse fungo foi de 51%; para *Phomopsis sojae* foi de 39% e para *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* foi de 12% (Tabela 9).

Para a cultivar Emgopa 313 os resultados obtidos para cada tratamento foram 53% de sementes infectadas com *C. dematium* var. *truncata*; 33% de sementes infectadas com *Phomopsis sojae* e 15% de sementes infectadas com *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (Tabela 9).

A porcentagem de *C. dematium* var. *truncata* nas sementes oriundas de plantas inoculadas em condições de campo, nas três cultivares, foi semelhante à porcentagem de sementes inoculadas pelo fungo em condições de laboratório na cultivar Embrapa 48, indicando a alta taxa de transmissão desse patógeno da planta mãe para as sementes.

Tabela 9. Incidência (%) dos fungos *Colletotrichum dematium* var. *truncata*, *Phomopsis sojae* e *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* nas sementes oriundas de plantas inoculadas no campo da cultivar Embrapa 48, Goiânia e Emgopa 313.

	..... Embrapa 48.....				.....Goiânia.....				.....Emgopa 313.....															
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4												
Fungos	C/D	S/D	C/D	S/D	C/D	S/D	C/D	S/D	C/D	S/D	C/D	S/D	C/D	S/D	C/D	S/D	C/D	S/D	C/D	S/D	C/D	S/D	C/D	S/D
<i>C. d. var. truncata</i>	-	-	55	59	-	-	-	-	-	-	51	52	-	-	-	-	-	-	53	50	-	-	-	-
<i>P. sojae</i>	-	-	-	-	43	48	-	-	-	-	-	-	39	42	-	-	-	-	-	-	33	40	-	-
<i>D. p. f. sp. meridionalis</i>	-	-	-	-	-	-	18	25	-	-	-	-	-	-	12	21	-	-	-	-	-	-	15	20

1-Testemunha; 2-*Colletotrichum dematium* var. *truncata*; 3- *Phomopsis sojae*; 4- *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* C/D- Sementes com desinfestação superficial; S/D- Sementes sem desinfestação superficial.

## 4.4.2. Testes de vigor

### 4.4.2.1. Teste de germinação

O teste de Germinação foi realizado em sementes colhidas de plantas inoculadas no campo, com os diferentes fungos e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 10

Para germinação em areia observou-se que houve diferença significativa em relação a testemunha nos resultados de todos os tratamentos, com exceção de *C. dematium* var. *truncata* e *P. sojae* na cultivar Goiânia, mostrando que os fungos em estudo afetaram a germinação das sementes.

Entre os tratamentos, as sementes inoculadas com *D. phaseolorum* f. sp. *meridionalis* apresentaram menores porcentagens de germinação seguidos pelos tratamentos de inoculação com *P. sojae* e *C. dematium* var. *truncata*.

Tabela 10. Interferência dos fungos *Colletotrichum dematium* var. *truncata*, *Phomopsis sojae* e *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* na germinação em areia e rolo de papel em sementes de soja, nas cultivares Embrapa 48, Goiânia e Emgopa 313 provenientes de plantas inoculadas no campo.

Tratamentos	Embrapa 48		Goiânia		Emgopa 313	
	areia	papel	areia	papel	areia	papel
Testemunha	66,0 a	64,17 a	61,7 a	64,53 a	73,9 a	64,19 a
<i>C. dematium</i> var. <i>truncata</i>	54,9 b	59,86 b	61,4 a	60,70 b	61,4 b	57,15 b
<i>P. sojae</i>	54,3 b	61,03 ab	58,5 ab	54,51 c	60,2 b	51,68 b
<i>D. p. f. sp. meridionalis</i>	53,7 b	55,56 c	51,9 b	53,29 c	55,9 b	53,15 b
CV (%)	6,00	2,95	6,29	2,91	7,40	4,66
D.M.S.	7,31	3,92	7,71	3,74	9,86	5,83

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ); CV(%) = Coeficiente de variação. Dados expressos em porcentagem.

No teste de germinação em rolo de papel os resultados foram semelhantes aos encontrados no teste de germinação em areia. Observa-se pela Tabela 10 que

de uma maneira geral *D. phaseolorum* f. sp. *meridionalis* foi mais efetivo em reduzir a germinação das sementes que os outros fungos em estudo.

Segundo HENNING (1996) plântulas oriundas de sementes com *Phomopsis* sp. que conseguem emergir são fracas ou têm cotilédones infectados, cujos sintomas só aparecem quando se aproxima da maturidade. Dependendo da incidência do fungo *Phomopsis* sp., em semente de soja, o teste padrão de germinação (rolo de papel, 25 °C) pode tornar-se inviável, enquanto que, o mesmo lote testado em caixa plástica com areia (germinação em areia) pode tornar o teste viável.

Todos os fungos reduziram o poder germinativo das sementes na cultivar Goiânia, no teste de germinação em rolo de papel. Esses resultados concordam com CARVALHO (1989), que verificou vários trabalhos evidenciando que os fungos transmitidos pelas sementes são responsáveis pela redução da germinação dessas, bem como de sua emergência em campo.

Analisando as Tabelas 5 e 10, para o teste de germinação tanto para sementes oriundas de planta inoculadas em campo das diferentes cultivares: Embrapa 48, Goiânia e Emgopa 313 como para sementes inoculadas em laboratório da cultivar Embrapa 48 observam-se diferenças significativas entre as sementes sadias e as inoculadas com os fungos em estudo, confirmando que as sementes infectadas sofrem perda de sua capacidade germinativa.

#### **4.4.2.2. Índice de velocidade de emergência (IVE), teste de frio (TF), envelhecimento acelerado (EA) e condutividade elétrica (CE)**

Os resultados dos testes de vigor: índice de velocidade de emergência (IVE), teste de frio (TF), envelhecimento acelerado (EA) e condutividade elétrica (CE) para a cultivar Embrapa 48, Goiânia e Emgopa 313 podem ser conferidos na Tabela 11.

Observa-se que ocorreu uma variação dos resultados em relação às sementes inoculadas em laboratório e sementes provenientes de plantas inoculadas no campo.

Na cultivar Embrapa 48 observa-se efeito dos fungos sobre o vigor das sementes de soja somente no teste IVE, onde a porcentagem de sementes germinadas foi maior na testemunha. Entre as sementes provenientes de plantas

inoculadas com os fungos em estudo a germinação foi significativamente menor, porém não diferiu entre eles.

Nos testes de vigor: TF e EA não se observou diferença significativa entre os tratamentos.

Com relação a condutividade elétrica (CE) os dados mostraram que embora não haja diferença estatística entre os resultados das sementes sadias e inoculadas com fungos, verifica-se que as sementes inoculadas com fungos apresentaram menor quantidade de lixiviado na água de embebição. Uma hipótese para explicar o ocorrido seria que o fungo consumiu nutrientes das sementes durante a colonização dos tecidos.

Na cultivar Goiânia verifica-se que não houve diferença estatística entre o IVE de sementes sadias e inoculadas, ou seja não houve interferência dos fungos na qualidade fisiológica das sementes dessa cultivar. O mesmo ocorreu para TF, EA e CE.

Para CE embora não tenha ocorrido diferença significativa entre sementes oriundas de plantas inoculadas e não inoculadas com fungo, a quantidade de lixiviados na água de embebição das sementes provenientes de plantas inoculadas foi menor que a da sadia.

Para EA verificou-se que o tratamento de inoculação com *D. phaseolorum* f. sp. *meridionalis* afetou o vigor das sementes e não diferiu estatisticamente de *P. sojae* que por sua vez também não diferiu do tratamento *C. dematium* var. *truncata*.

O melhor desempenho germinativo foi verificado entre as sementes provenientes de plantas não inoculadas que por sua vez também não diferiu das sementes oriundas de plantas inoculadas com *C. dematium* var. *truncata*.

Com relação a cultivar Emgopa 313 não houve interferência dos fungos em estudo no vigor das sementes pelos testes de: IVE, TF e CE.

No teste de condutividade elétrica o resultado encontrado foi semelhante para as três cultivares estudadas. Embora não tenha ocorrido diferença significativa entre as sementes oriundas de plantas inoculadas com os fungos e não inoculadas, verificou-se que o valor da CE na água de embebição das sementes foi menor naquelas inoculadas com os fungos, reforçando mais uma vez a hipótese de que ao parasitar os tecidos das sementes o fungo consumiu nutrientes.



Tabela 11. Interferência dos fungos *Colletotrichum dematium* var. *truncata*, *Phomopsis sojae* e *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* nos resultados dos testes de vigor avaliados pelo índice de velocidade de emergência em areia (IVE), teste frio (TF), envelhecimento acelerado (EA), condutividade elétrica (CE) em sementes de soja nas cultivares Embrapa 48, Goiânia e Emgopa 313.

	----- EMBRAPA 48 -----				----- GOIÂNIA -----				----- EMGOPA 313 -----			
	IVE	TF	EA	CE	IVE	TF)	EA)	CE	IVE	TF	EA	CE
Testemunha	41,7 a	64,2 a	73,4 a	112,7 a	39,2 a	66,0 a	79,2 a	90,5 a	39,3 a	74,1 a	79,1 a	104,1 a
<i>C. d. var. truncata</i>	34,3 b	60,7 a	72,1 a	95,2 a	39,0 a	64,4 a	76,9 ab	89,3a	39,6 a	71,2 a	70,2 a	93,5 a
<i>P. sojae</i>	33,9 b	57,9 a	69,1a	83,8 a	37,5 a	63,1 a	61,3 bc	74,8 a	37,9 a	69,5 a	59,8 b	85,6 a
<i>D. p. f. sp. meridionalis</i>	33,8 b	57,2 a	65,3 a	82,8 a	33,1 a	58,4 a	55,8 c	72,0 a	33,8 a	67,2a	58,8 b	84,6 a
D.M.S.	7,3	8,4	7,5	15,4	8,21	10,27	15,83	25,85	8,21	13,25	7,58	37,34
CV (%)	5,5	10,6	11,1	30,4	10,5	7,7	11,0	15,0	10,50	8,95	5,54	19,32

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ); CV(%) = Coeficiente de variação. Dados originais para IVE, TF, EA expressos em porcentagem. Para CE dados expressos em  $\mu\text{Scm}^1\text{g}^1$ .

Esse fato leva a crer que o valor da CE na água de embebição das sementes não é um vigor de sementes.

No teste de EA verificou-se que os fungos *P. sojae* e *D. phaseolorum* f. sp. *meridionalis* influenciaram negativamente no vigor das sementes, ou seja afetaram a germinação.

#### **4.4.3. Composição química da água de embebição das sementes**

Entre os eletrólitos liberados pelas sementes durante a embebição, uma porção significativa é representada por vários íons inorgânicos e dentre esses destacam-se Potássio (K), Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg).

Os resultados da concentração dos íons Potássio (K), Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg) na solução de embebição das sementes do teste de condutividade elétrica são apresentados na Tabela 12.

Observa-se que o íon mais lixiviado das sementes de soja da cultivar nas três cultivares foi o K, seguido de Ca e Mg. Esses dados concordam com os encontrados por LEE & KARUNANITHI (1990), que verificaram para sementes de feijão e soja resultados semelhantes, ou seja, as perdas de K foram muito altas, enquanto que as perdas de íon bivalentes, tais como Cálcio e Magnésio foram moderadas. Segundo os autores uma hipótese para explicar o ocorrido seria a habilidade de formarem complexos com proteínas e ácido fítico.

Os dados obtidos na Tabela 12, permitem concluir que de maneira geral, sementes oriundas de plantas inoculadas no campo com os fungos em estudo perderam menor quantidade de K, Ca e Mg para a água de embebição. Isso ocorreu, provavelmente porque os fungos devem ter consumido esses íons durante sua colonização das sementes.

Para a cultivar Embrapa 48 a quantidade de K, Ca e Mg na água de embebição das sementes oriundas de plantas inoculadas no campo com *D. phaseolorum* f. sp. *meridionalis* e *P. sojae* foi significativamente menor quando comparadas com sementes oriundas de plantas inoculadas com *C. dematium* var.

*truncata* que por sua vez também não diferiu do tratamento testemunha.

Segundo GRIFFIN (1994) os fungos degradam compostos reciclando carbono, nitrogênio e enxofre como nutrientes para o crescimento, causando deterioração de materiais.

Com relação a cultivar Goiânia o íon mais lixiviado para a água de embebição das sementes foi o potássio (K), seguido do Cálcio (Ca) e Magnésio como no caso da cultivar Embrapa 48.

Não foi observado diferença significativa ente a lixiviação de potássio, Cálcio e Magnésio nas sementes dos diferentes tratamentos para as cultivares Goiânia e Emgopa 313.

#### **4.4.4. Teor de água das sementes (TA)**

O teor de água das sementes provenientes de plantas inoculadas no campo com os fungos em estudo calculado antes e após o envelhecimento acelerado está presente na Tabela 13.

O teor de água das sementes apresentou variações dentro do padrão aceito, 1- 4 pontos percentuais (MARCOS FILHO, 1987). No caso do teor de água, esse aspecto deve ser ressaltado, pois quando variações muito grandes são verificadas, pode haver interferência nos resultados dos testes tanto de envelhecimento acelerado, por haver variação acentuada na velocidade de umedecimento (diferentes intensidades de deterioração) durante o teste (MARCOS FILHO, 1987), assim como para o teste de condutividade elétrica, conforme observados por vários autores (TAO, 1978; LOEFLER et al., HAMPTON & TEKRONY, 1995; VIEIRA & KRZYZANOWSK , 2002).

Um dos indicadores da uniformidade das condições do envelhecimento acelerado é o teor de água das sementes antes e também após o teste, pois as mais úmidas são mais sensíveis às condições do teste e, portanto, sujeitas a deterioração mais intensa. Ao final do envelhecimento acelerado, essa mesma variação é tolerada, indicando uniformidade no teste. Atualmente a recomendação enfatiza variação inferior a 2 pontos percentuais no teor de água na instalação, e após o teste

Tabela 12. Concentração de potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) na água de embebição de sementes de soja oriundas das cultivares Embrapa 48, Goiânia e Emgopa 313, inoculadas no campo com os fungos *Colletotrichum dematium* var. *truncata*, *Phomopsis sojae* e *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*.

	.....EMBRAPA 48 .....			.....GOIÂNIA.....			.....EMGOPA 313 .....		
	K	Ca	Mg	K	Ca	Mg	K	Ca	Mg
Testemunha	2573,7 a	151,5 a	141,7 a	1968,0 a	124,7 a	103,2 a	2264,5 a	104,0 a	101,7 a
<i>C. d. var. truncata</i>	2023,7 ab	130,7 ab	117,5 ab	1938,5 a	120,0 a	97,7 a	2254,7 a	98,5 a	98,5 a
<i>P. sojae</i>	1850,5 b	109,7 b	92,5 b	1654,5 a	103,2 a	94,2 a	1951,2 a	91,5 a	94,2 a
<i>D. p. f. sp. meridionalis.</i>	1830,0 b	103,0 b	92,0 b	1534,0 a	102,2 a	97,4 a	1782,0 a	86,5 a	90,1 a
Médias	2069,5	123,7	110,9	1773,8	112,5	98,3	2063,1	95,1	93,7
D.M.S.	14,6	14,7	19,53	15,3	15,5	14,1	12,74	18,1	19,8
CV (%)	634,9	38,4	45,4	569,9	36,8	35,4	551,7	36,2	39,0

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P > 0,05$ ); CV= Coeficiente de variação. K, Ca e Mg – dados expressos em mg/Kg de sementes.

submetido ao envelhecimento acelerado, porém se excederem esses limites são considerados excessivos e determinam a necessidade de repetição do teste (MARCOS FILHO, 1987).

Tabela 13. Teor de água de sementes de soja, cultivar Embrapa 48, Goiânia e Emgopa 313 antes e após o envelhecimento acelerados, em função dos tratamentos instalados em condições de campo.

Fungos	Embrapa 48		Goiânia		Emgopa 313	
	1	2	1	2	1	2
Testemunha	9,11	23,10	9,15	23,14	9,20	23,20
<i>C. dematium</i> var. <i>truncata</i>	8,50	22,20	8,76	23,10	8,40	22,10
<i>Phomopsis sojae</i>	8,52	22,22	8,74	23,07	8,38	22,08
<i>D. phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i>	8,69	22,90	8,86	23,11	8,35	22,05

1-Teor de água inicial da semente; 2- Teor de água após o envelhecimento acelerado. Dados expressos em porcentagem.

#### 4.4.5. Peso de 1000 sementes

Os resultados do peso de 1000 nas sementes provenientes de plantas inoculadas em campo podem ser conferidos na Tabela 14.

Para a cultivar Goiânia a inoculação dos fungos não interferiu significativamente nesse parâmetro. Situação semelhante ocorreu para a cultivar Emgopa 313 onde o tratamento testemunha e dos fungos *Colletotrichum dematium* var. *truncata* e *Phomopsis sojae* não diferiram estatisticamente entre si, apenas o fungo *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* reduziu significativamente o peso de 1000 sementes.

Para a cultivar Embrapa 48 o fungo *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* e *Phomopsis sojae* afetaram significativamente o peso de 1000 sementes quando comparados com a testemunha que por sua vez não diferiu significativamente do tratamento com *Colletotrichum dematium* var. *truncata*.

Tabela 14. Efeito dos fungos *Colletotrichum dematium* var. *truncata*, *Phomopsis sojae* e *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* inoculadas em plantas no campo nas cultivares Embrapa 48, Goiânia e Emgopa 313, no Peso de 1000 sementes.

Tratamentos	Embrapa 48	Goiânia	Emgopa313
	-----	(g) -----	
Testemunha	145,5 a	176,7 a	171,4 a
<i>C. dematium</i> var. <i>truncata</i>	143,0 ab	174,8 a	167,8 a
<i>Phomopsis sojae</i>	137,0 bc	170,2 a	164,2 a
<i>D. phaseolorum</i> f. sp. <i>meridionalis</i>	135,2 c	169,2 a	150,2 b
CV (%)	3,45	10,99	5,73
D.M.S.	6,60	25,93	12,78

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ); CV(%) = Coeficiente de variação.

## V. CONCLUSÃO

Os dados obtidos nesse trabalho permitem concluir que:

- A inoculação artificial de sementes, por sobreposição dessas em meio de cultura por 20 horas com os fungos *Colletotrichum dematium* var. *truncata*, *Phomopsis sojae* e *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* na cultivar Embrapa 48 é eficiente para o estudo da interferência desses organismos na qualidade fisiológica das sementes
- Os fungos *Colletotrichum dematium* var. *truncata*, *Phomopsis sojae* e *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* inoculados artificialmente em sementes de soja da cultivar Embrapa 48 afetam negativamente a germinação.
- O uso de Manitol para restrição hídrica (-1 MPa) em meio da cultura BDA pode ser recomendado em inoculações artificiais de sementes com fungos, por não alterar a eficiência do processo de infecção e evitar o excesso de absorção de água do meio de cultura, pelas sementes.
- Os fungos *Colletotrichum dematium* var. *truncata*, *Phomopsis sojae* e *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* afetam o vigor das sementes o que pode ser detectado pelo índice de velocidade de emergência, teste frio e envelhecimento acelerado em sementes de soja inoculadas artificialmente em laboratório.
- Os fungos em estudo, quando presentes nas sementes, influenciam no resultado do teste de condutividade elétrica levando a interpretação errônea no que diz respeito à avaliação do vigor de sementes.

- *Colletotrichum dematium* var. *truncata*, *Phomopsis sojæ* e *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, quando presentes nas sementes afetam a concentração de Potássio, Cálcio e Magnésio na água de embebição.



## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBAYO, A. A.; HARRIS, R.F. Fungal grow responses to osmotic as compared to matrica water potencial. **Soil Science Society of America Proceedings**, Madison, v. 85, n. 3, p. 465-469, 1971.

AGARWAL, V. K.; SINCLAIR, J. B. **Principies of seed pathology**. Boca Raton: CRC Press, 1997. 244p.

ALBUQUERQUE, M. C.; MORO, F. V.; FAGIOLI, M.; RIBEIRO, M. Testes de condutividade elétrica e de lixiviação de potássio na avaliação da qualidade fisiológica das sementes de girassol. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.23, n.1, p.1-18, 2001.

ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J. F. V.; GODOY, C. V.; COSTAMILAN, L. M.; MEYER, M. C. **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. 581p.

BALARDIN, R. S.; DAL PIVA, C. A.; OGLIARI, P. J. Sanidade de sementes de feijão, no Estado de Santa Catarina- Resultados preliminares. **Ciência rural**, Santa Maria, v.22, n.2, p.151-155, 1992.

BARBEDO, C. J.; CICERO, S. M. Utilização do teste de condutividade elétrica para previsão do potencial germinativo de sementes de Ingá. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.55, n.2, p.249-259, 1998.

BATAGLIA, O. C.; FURLANI, A. M. C.; TEIXEIRA, J. P. F.; FURLANI, P. R.; GALLO, J. R. **Métodos de análise química de plantas**. Campinas, Instituto Agronômico de Campinas, 1983. 78p. (Boletim Técnico, 78).

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds**: physiology of development and germination. New York: Plenum Press, 1985. 367

BITTENCOURT, S. R. M.; VIEIRA, R. D. Efeito da combinação de diferentes temperaturas e períodos de exposição de sementes de milho no teste de envelhecimento acelerado. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.27, p.170, 1997.

BIZETTO, A.; HOMECHIN, M. Efeito do período e da temperatura de armazenamento na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja com altos índices de *Phomopsis sojae* (Leh.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.19, n.2, p.196-303, 1997.

BRACCINI, A. L.; REIS, S.; SEDIYAMA, C. S.; SEDIYAMA, T. Avaliação da qualidade fisiológica e sanitária da semente de genótipo de soja ( *Glycine max* (L.) Merrill) com diferentes graus de impermeabilidade do tegumento. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.16, n.2, p.195-200, 2003.

BRADNOCK, W. T.; MATTHEWS, S. Assessing field emergence potential of wrinkle-seeded peas. **Horticultural Research**, Edinburgh, v.10, n. 3, p.50-58, 1970.

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

BRUGGING, H.; KRAAK, H. L.; DIJKEMA, M. H. G. E.; BEKENDAM, J. Some factors influencing electrolyte leakage from maize (*Zea mays* L.) kernels. *Seed Science Research*, London, v.1, n.1, p.15-20, 1991.

CARVALHO, H. P. **Aspectos patológicos e fisiológicos de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizadas na região Sul do Estado de Minas Gerais**. 1989. 79 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Escola Superior de Agronomia de Lavras, Lavras, 1989.

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

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, tecnologia e produção**. 3 ed. Campinas: Fundação Cargil, 1988. 424 p.

CARVALHO, N. M. O conceito de vigor em sementes. In: VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N.M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: Funep, 1994.p.1-30.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; MEDEIROS, C. A.; MOURA, B. Efeito do tratamento de sementes de milho com fungicidas, na proteção de fungos de solo no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v.20, n.4, p.633-638, 1995.

CHRISTENSEN, C. M.; KAUFMANN, H. H. Deterioration of stored grains by fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.3, n.1, p.69-84, 1965.

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

DIAS, D. C. F. S.; MARCOS FILHO, J. Tese de vigor baseados na permeabilidade de membranas celulares : Lixiviação de Potássio. **Informativo ABRATES**, Brasília, v.5, n.1, p.37-41, 1995.

DIAS, D. C. F. S.; VIEIRA, A. N.; TILLMANN, M. A.; VILLELA, F. A.; NOTON, V. S. Teste de condutividade elétrica e lixiviação de potássio para avaliação de vigor em sementes de hortaliças: feijão-de vagem e quiabo. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.20,n.2, p.408-413, 1998.

DRINGRA, O. D.; ACUÑA, R. S. **Patologia de sementes de soja**. Viçosa: Ed. UFV, 1997. 119P

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Tecnologia de produção de soja, região central do Brasil-2006**. Londrina: Sistema de Produção/ EMBRAPA- soja, 2006. 220p.

FERGUSON, J. M. **Metabolic and biochemical changes during the early stage of soybean seed deterioration**. 1988. 137f. Dissertation (PHD)- University of Kentucky, Lexington, USA, 1988.

FRANÇA NETO, J. B.; HENNING, A. A. **Qualidades fisiológicas e sanitárias de sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA- CNPSO, 1984. 39 p. (Circular Técnica, 9).

FRANÇA NETO, J. B.; WEST, S. H. Effects of *Phomopsis sojae* on viability and quality of soybean seed. **Journal of Seed Technology**, Springfield, v.14, n.3, p.125-231, 1989.

FRIGERI, T. **Interferência de patógenos nos resultados dos testes de vigor em sementes de feijoeiro**. 2007. 77p. Tese (Mestrado em Agronomia)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias "Julio de Mesquita Filho" -Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

GAO, S.; SHAIN, L. Effect of osmotic potencial on virulent and hypovirulent strains of the Chestnut blight fungus. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v.25, n.6, p.1024-1029, 1995.

GASPAR, C. M.; NAKAGAWA, J. Teste de condutividade elétrica em função do número de sementes e da qualidade de água para sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.24, n.2, p.70-76, 2002.

GOULART, A. C. P. **Fungos em sementes de soja**: detecção e importância. Dourados: EMBRAPA- CPAO, 1997. 58p.

GRIFFIN, H. D. **Fungal physiology**. 2. ED. New York: Wiley, 1994. 458 p. (Science Paperback Series).

HAMPTON, J. G.; TEKRONY, D. M. **Hanbook of vigour test methods**. Zurich: ISTA. 1995. 117P.

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

ILYAS, M. B.; DRINGRA, O. D.; ELLIS, M. A.; SINCLAIR, J. B. Location of mycelium of *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* and *Cecospora kikuchii* in infected soybean seeds. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, n.3, v.59, p.17-19, 1975.

KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA NETO, J. B.; HENNINGH, A. A. Relato dos testes de vigor disponíveis para as grandes culturas. **Informativo ABRATES**, Brasília, v.1, n. 2, p.15-50, 1991.

KUO, W. J. Delayed- permeability of soybean seeds; characteristics and screening mrthodology. **Seed Science &Technology**, Zurich, v.17, p.131-142. 1989

LEE, C. K.; KARUNANITHY, R. Effcts of germination on the chemical composition of Glycine and Phaseolus beans. **Journal Science of Food Agriculture**, Washington, v.51, n.4, p.437-445, 1990.

LIMONARD, T. A modified blotter test for seed health. **Netherlands Journal of Plant Phathology**, Wageningen, v. 72, p.319-321, 1966

LOEFFLER, T. M.; TEKRONY, D. M.; EGLI, D. B. The bulk conductivity test as an indicator of soybean seed quality. **Journal of Seed Technology**, Michigan, v. 12, n. 1, p.37-53, 1988.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes**: fundamentos e aplicações. Lavras: ESAL/FAEPE, 1998. 107P.

MAGUIRE, J. D. Speeds of germination selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, p.176-177, 1962.

MANN, E. N.; RESENDE, P. M.; MANN, R. S.; CARVALHO, J. G.; VON PINHO, E. V. R. Efeito da aplicação de manganês no rendimento e na qualidade de sementes de soja. **Revista Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.12, p.1757-1764, 2002.

MARCHI, J. L.; CICERO, S. M. Procedimentos para a condução do teste de condutividade elétrica em sementes. **Informativo ABRATES**, Brasília, v.12, n.1,3, p.20-26, 2002.

MARCOS FILHO, J. Testes de vigor: importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes**: conceitos e testes. Londrina: Abrates, 1987. 218p.

MARCOS FILHO, J.; CÍCERO, S. M.; SILVA, W. R. **Avaliação da qualidade das sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1982. 230 p.

MARCOS FILHO, J.; SILVA, W. R.; NOVEMBRE, A. D. C.; PESCARIN-CHAMMA, H.M.C. Estudo Comparativo de métodos para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja com ênfase ao teste de condutividade elétrica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.25, n.12, p.1805-1815, 1990.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994.p. 133-149.

MENTEN, M. Prejuízos causados por patógenos às sementes In: **Patógenos em sementes** : detecção, danos e controle químico. Piracicaba: FEALQ, 1991. p. 115-136.

MENTEN, J. O. M. Importância do tratamento de sementes. In: **Patógenos em sementes**: detecção, danos e controle químico. Piracicaba: FEALQ, 1997, p.203-217.

NADALETO, C. E. S. **Efeito de *Macrophomina phaseolina* sobre a qualidade fisiológica de sementes de feijoeiro**. 2004. 41f. Monografia (Trabalho de Graduação em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias 'Julio Mesquita Filho', Universidade Estadual Paulista , Jaboticabal, 2004.

NAKAGAWA, J. **Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas**. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes**: conceitos e testes. Londrina: Abrates, 1999. 218p.

NAKAGAWA, J.; CAVARIANAI, C.; GUISTEM, J. M. Efeito da adubação fosfatada e potássica no teste de condutividade elétrica das sementes de aveia- preta. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.23, n.2, p.302-308, 2001.

NOVEMBRE, A. D. L. C. **Avaliação da qualidade de sementes**, Londrina. 2001. Disponível em: <<http://www.seednews.inf.br>>. Acesso em: 2 jul. 2006.

PANOBIANCO, M; VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKY, F. C. Variação na condutividade elétrica de sementes de diferentes genótipos de soja e sua relação

com o conteúdo de lignina no tegumento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 7., 1997, Foz do Iguaçu. Campinas: **ABRATES**, 1997. p.173.

PILL, W. G. Low water potencial and pressing germination treatments to improve seed quality. In: BARSA, A. S. **Seed quality**: basic mechanisms and agricultural implications. New York; Food Products Press, 1994. p. 319-359.

PINTO, G. S. ***Rhizoctonia solani* sobre a qualidade fisiológica de sementes de feijoeiro**. 2005. 32f. Monografia (Trabalho de Graduação em Agronomia)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias “Julio de Mesquita Filho”, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

POLLOCK, B. M. Imbibition temperature sensitive of lima bean seeds controlled by initial seed moisture. **Plant Physiology**, Rockville, v.44, n.2, p.907-911, 1969.

RAMOS, D. P. **Efeito de *Fusarium graminearum* sobre o desempenho de sementes de milho**. 2005. 55f. Monografia (Trabalho de Graduação em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias “Julio de Mesquita Filho”, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

ROSA, S. D. V. F.; VON PINHO, E. V. R.; VIEIRA, M. G. G. C.; VEIGA, R. D. Eficácia do teste de condutividade elétrica para o uso em estudo de danos de secagem em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.22, n.1, p.54-63, 2000.

RODO, A. B.; TILLMANN, M. A. A.; VILLELA, F. A.; SAMPAIO, N. V. Teste de condutividade elétrica em sementes de tomate. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 20, n.1, p.29-38, 1998.

SÁ, M. E. Condutividade elétrica em sementes de tomate (*Lycopersicon lycopersicum* L.). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.56, n.1, p.13-20, 1999.



SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant physiology**. 4<sup>a</sup> ed. Belmont: Wadsworth, 1991. 682 p.

SCHNEIDER, R. W.; DRINGRA, O. D.; NICHOLSON, J. F.; SINCLAIR, J. B. *Colletotrichum truncatum* borne within the seed coat of soybean. **Phytopathology**, St. Paul, v.64, p.154-155, 1974.

SHIOGA, P. S. **Controle da hidratação e desempenho das sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1990. 106 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Fitotecnia)- Escola Superior Agronomia "Luis de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1990.

SUBBARAO, K. V.; MICHAILIDES, T. J.; MORGAN, D. P. Effects of osmotic potencial and temperature on growth of two pathogens of figs and a biocontrol agent. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n.12, p.1454-1459, 1993.

TANAKA, M. A. S.; MENTEN, J. O. M.; MARIANNO, M. I. A.; Inoculação artificial de sementes de algodão com *Colletotrichum gosypii* var. *cephalosporioides* e infecção das sementes em função do tempo de exposição ao patógeno. **Summa Phytopatologica**, Jaguariúna, v.15, n.2, p.232-237, 1989.

TAO, K. L. J. Factors causing variations in the conductivity test for soybean. **Journal of Seed Technology**, Michigan, v.3, n.1, p.10-18, 1978.

TASSI, A. L. W. **Teste de condutividade elétrica e presença de patógenos em sementes de soja**. 2007. 41p. Tese (Mestrado em Agronomia)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias "Julio Mesquita Filho" Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

TIFFANY, L. M. Delayed sporulation of *Colletotrichum* on soybean. **Phytopathology**, Lancaster, v.41, p. 975-85, 1951.

THOMAS, J. C.; SEPAHI, M.; ARENDALL, B.; BOHNERT, H. T. Enhancement of seed germination in high salinity by engineering mannitol expression in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell and Environment**. Oxford, v.18, n.7, p.801-806, 1995.

VANZOLINI, S.; NAKAGAWA, J. Teste de condutividade elétrica em genótipos de sementes de amendoim. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.20, n.1, p.178-183, 1998.

VANZOLINI, S.; NAKAGAWA, J. Teste de condutividade elétrica em sementes de amendoim: efeitos de temperatura e de período de embebição. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.21, n.1, p.41-45, 1999.

VIEIRA, R. D. Teste de condutividade elétrica. In: VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: Funep, 1994. p. 103-139.

VIEIRA, R. D.; PANOBIANCO, M.; LEMOS, L. B.; FORNASIERI, D. Efeito de genótipos de feijão e de soja sobre os resultados da condutividade elétrica em sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.18, n.2, p.220-224, 1996.

VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: Abrates, 1999. 218p.

VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 2002. cap .4, p.1-26.

VIEIRA, R. D. ; TEKRONY, D. M.; EGLI, D. B.; RUCHER, M. Electrical conductivity of soybean seeds after storage in several environments. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.9, n.3, p.599-608, 2001.

YORINORI, J. T. **Controle de doenças e plantas:** grandes culturas. Brasília: (Editora). 1997. p. 953-1024.

WOODSTOCK, L. W.; Physiological and biochemical test for seed vigor. **Seed Science & Technology**, Zurich, v.1,p.127-157, 1973.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)