

Manual de Identificação de Doenças e Fungos em *Arachis spp.*



ISSN 0104-9046

Dezembro, 2014

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

Documentos 133

Manual de Identificação de Doenças e Fungos em *Arachis* spp.

*Rivaldalve Coelho Gonçalves
Paulo Eduardo França de Macedo
José Henrique Vallim
Josy Soares de Assunção
Sônia Regina Nogueira*

Embrapa Acre
Rio Branco, AC
2014

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Acre

Rodovia BR 364, km 14 (Rio Branco/Porto Velho)

Caixa Postal 321

CEP 69900-970 Rio Branco-AC

Fone: (68) 3212-3200

Fax: (68) 3212-3284

<https://www.embrapa.br/acre>

www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *José Marques Carneiro Júnior*

Secretária-Executiva: *Claudia Carvalho Sena*

Membros: *Carlos Mauricio Soares de Andrade, Clarissa Reschke da Cunha, José Tadeu de Souza Marinho, Lúcia Helena de Oliveira Wadt, Luciano Arruda Ribas, Patrícia Silva Flores, Rodrigo Souza Santos, Tadário Kamel de Oliveira, Tatiana de Campos*

Supervisão editorial: *Claudia Carvalho Sena / Suely Moreira de Melo*

Revisão de texto: *Claudia Carvalho Sena / Suely Moreira de Melo*

Normalização bibliográfica: *Renata do Carmo França Seabra*

Editoração eletrônica: *Bruno Imbroisi*

Foto da capa: *Rivaldalve Coelho Gonçalves*

1ª edição

1ª impressão (2014): 300 exemplares

Todos os direitos reservados

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Acre

Manual de identificação de doenças e fungos em *Arachis* spp. / autores, Rivaldalve Coelho Gonçalves... [et al.]. – Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2014.

73 p. : il. color. – (Documentos / Embrapa Acre, ISSN 0104-9046; 133).

1. Fitopatologia. 2. Doença – planta. 3. Fungo – planta. 4. *Arachis* spp.
5. Amazônia – Acre – Brasil. I. Embrapa Acre. II. Série.

CDD 632.4 (21. ed.)

Autores

Rivaldalve Coelho Gonçalves

Engenheiro florestal, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Acre, Rio Branco, AC

Paulo Eduardo França de Macedo

Engenheiro-agrônomo, mestre em Fitopatologia, analista da Embrapa Acre, Rio Branco, AC

José Henrique Vallim

Farmacêutico bioquímico, mestre em Biotecnologia Médica, analista da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP

Josy Soares de Assunção

Bióloga, assistente da Embrapa Acre, Rio Branco, AC

Sônia Regina Nogueira

Engenheira-agrônoma, doutora em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Acre, Rio Branco, AC

Apresentação

Plantas do gênero *Arachis* são conhecidas da humanidade há cerca de 8 mil anos. O termo amendoim é originário de mǎdu'bi, da língua tupi. As espécies forrageiras são comumente chamadas de amendoim forrageiro ou até grama amendoim no Brasil. A espécie *Arachis pintoii* Krapovickas & Gregory, exclusivamente forrageira, vem sendo cada vez mais usada para pastejo de animais devido à quantidade de proteínas e biomassa produzida, além do uso na jardinagem e paisagismo em áreas urbanas e rurais. Essa preferência pela espécie baseia-se em longo histórico de sucesso em outros países para a finalidade a que se destina. Outras espécies encontradas nesse gênero e utilizadas em programas de melhoramento genético de amendoim forrageiro para a produção de proteína a baixo custo são *Arachis repens* Handro, *Arachis glabrata* Benth., *Arachis valsii* Miotto, *Arachis appressipila* Krapov & W. C. Greg. e *Arachis helodes* Mart. ex Krapov. & Rigoni.

Algumas doenças fúngicas afetam *A. pintoii* quando este se encontra estabelecido no campo ou em viveiro, casas de vegetação ou telado. No entanto, fungos que ocorrem nas sementes têm importante papel na disseminação de doença a longa distância e no estabelecimento de plantas de amendoim forrageiro no campo seja para multiplicação ou para uso definitivo.

O conhecimento da diversidade de fungos fitopatogênicos e saprófitas que ocorrem em *Arachis* spp. é de fundamental relevância para os trabalhos de diagnósticos, para a emissão de certificados fitossanitários de origem, certificados fitossanitários, ações de defesa vegetal, segurança no trabalho e para o controle de doenças.

Desse modo, foi elaborado este Manual que, além de ser um guia ilustrado para a identificação de doenças, também traz informações de como isolar e caracterizar taxonomicamente os fungos associados ao amendoim forrageiro. Esta publicação é destinada aos produtores, estudantes, professores, pesquisadores, técnicos e todos aqueles que se interessam pela cultura do amendoim forrageiro nos campos e nas cidades, em atividades produtivas, educacionais e de extensão.

Eufran Ferreira do Amaral
Chefe-Geral da Embrapa Acre

Sumário

1. Introdução	13
2. Fungos e doenças de plantas	16
3. Fungos em sementes, folhas e hastes de <i>Arachis</i> spp.	19
4. Técnicas de montagem de lâminas temporárias e registro das informações para o diagnóstico de doença ..	21
5. Descrição das doenças e dos fungos de <i>Arachis</i> spp. ...	26
5.1. Ferrugem-do-amendoim-forrageiro	26
5.2. Mancha-foliar-de-colletotrichum-do-amendoim-forrageiro	33
5.3. Antracnose-da-haste-do-amendoim-forrageiro	37
5.4. Teste de patogenicidade de <i>Glomerella cingulata</i>	45
5.5. Mancha-de-mycosphaerella-do-amendoim-forrageiro	47
5.6. Podridão-da-haste e queima-foliar-de-athelia-do-amendoim-forrageiro	54
5.7. Queima-foliar-de-rhizoctonia-do-amendoim-forrageiro	60
6. Referências	67

Lista de figuras

Figura 1. Micocultura em placa de Petri (A) e itens necessários para a montagem de lâminas de microscopia (B).	24
Figura 2. Sistema de obtenção de imagens microscópicas com câmera digital SLR (A) e com câmera de vídeo combinada com programa de computador (B).	25
Figura 3. Lesões de ferrugem cor marrom na face adaxial (A) e abaxial (B e C) em folíolos de <i>Arachis pintoi</i> e lesões de ferrugem com halo amarelado em <i>A. pintoi</i> (D) e em <i>A. repens</i> (E).	28
Figura 4. Folhas de <i>A. repens</i> com ferrugem-do-amendoim-forrageiro na face abaxial (A), adaxial (B) e no pecíolo (B).	29
Figura 5. Urédia de <i>Puccinia arachidis</i> formada em <i>A. pintoi</i> cv. BRS Mandobi (A) e uredósporos em diferentes estádios de amadurecimento (B, C e D).	30
Figura 6. Folíolos de amendoim forrageiro com sintomas típicos da doença MFCAF (A, B, C e D) e folíolos com MFCAF e injúria de inseto (D).	35
Figura 7. Acérvulos sinemoides com setas pretas e conidióforos (A) e conídios cilíndricos (A e B) do fungo <i>G. cingulata</i> oriundos de folhas com doença	36
Figura 8. Esporodóquios produzidos pelo fungo <i>G. cingulata</i> em meio de cultura (A e B) e conídios germinados com apressórios (setas) (C e D).	37
Figura 9. Estolões com sintomas de antracnose-da-haste-do-amendoim-forrageiro com presença de lesões longilíneas (A, B e C) e massa de esporos em acérvulos (D).	38
Figura 10. Acérvulos de <i>G. cingulata</i> (A), agente causal da antracnose-da-haste-do-amendoim-forrageiro, evidenciando a presença de setas negras e conídios do patógeno (B).	39
Figura 11. Aspecto macromorfológico das colônias de <i>G. cingulata</i> obtidas por isolamento indireto com meio BDA a partir de <i>Arachis pintoi</i> : visão superior (A) e verso das colônias (B).	45
Figura 12. Folíolos inferiores inoculados, apresentando sintomas da MFCAF, e folíolos superiores não inoculados, sem sintomas da doença (A); colônias de <i>G. cingulata</i> , obtidas por isolamento indireto de folhas inoculadas em laboratório (B).	47
Figura 13. Folhas com sintomas da mancha-de-mycosphaerella-do-amendoim-forrageiro em <i>Arachis pintoi</i> cv. BRS Mandobi: folíolos com lesões escuras, halo amarelo e desfolha (A); folíolos com lesões escuras com e sem halo amarelo (B, C e D).	48
Figura 14. Sinêmio com conidióforos curtos geniculados (A) e conidióforos não geniculados (B) do anamorfo de <i>M. berkeleyi</i> a partir de <i>Arachis pintoi</i> cv. BRS Mandobi.	49
Figura 15. Sinêmio do anamorfo de <i>M. berkeleyi</i> a partir de <i>Arachis pintoi</i> cv. BRS Mandobi mostrando conidiogênese (A) e conídios com cicatrizes pronunciadas na base (B, C, D e E).	50
Figura 16. Planta de <i>A. pintoi</i> morta pela doença podridão-da-haste e queima-foliar-de-athelia (A) e rizomorfias brancas do anamorfo do patógeno (B).	56
Figura 17. Micélio branco cotonoso e escleródios marrom-avermelhados do fungo <i>A. rolfsii</i> em sua fase de anamorfo (A) e corte transversal de escleródio visto ao microscópio de luz comum (B).	57

Figura 18. Colônias do anamorfo do fungo <i>A. rolfsii</i> a partir de tecidos infectados da haste do amendoim forrageiro (A) e verso de colônias do fungo crescidas a partir de escleródios (B).	58
Figura 19. Folhas de <i>A. pintoii</i> em teste de patogenicidade: folha não inoculada, sadia (A) e folha inoculada, doente (B), 6 dias após a inoculação.	60
Figura 20. Plantas de <i>A. pintoii</i> em câmara úmida (A), planta não inoculada com aspecto saudável (B) e planta murcha pela doença podridão-da-haste (C).	60
Figura 21. Plantas de <i>A. repens</i> (A) e <i>A. pintoii</i> cv. BRS Mandobi (B) em Rio Branco, AC, apresentando sintomas da queima-foliar-de-rhizoctonia, com destaque para a teia micélica do patógeno (B).	62
Figura 22. Hifas de <i>T. cucumeris</i> corado com azul de algodão (A), colônia com escleródios (B e C) e hifas do patógeno de <i>Arachis</i> spp., em teste de anastomose (D).	63
Figura 23. Colônias ralas de <i>T. cucumeris</i> em atividade de isolamento indireto do patógeno a partir de folhas doentes de <i>A. pintoii</i> (A) e lâmina com escleródio formado a partir de lesão foliar do patógeno em <i>Cynodon nlenfluensis</i> Vanderyst (B).	65
Figura 24. Folhas de <i>A. pintoii</i> em teste de patogenicidade de <i>T. cucumeris</i> : folha não inoculada, sadia (A) e folha inoculada, doente (B).	66

Lista de tabelas

Tabela 1. Frequência de ocorrência de fungos em amostras de <i>Arachis</i> spp. coletadas em Rio Branco, Acre.	21
Tabela 2. Composição do líquido de montagem à base de azul de algodão.	22
Tabela 3. Gama de hospedeiros do fungo <i>Puccinia arachidis</i> causando ferrugem em condições de infecção natural no campo em Rio Branco, AC.	32
Tabela 4. Gama de hospedeiros de <i>Glomerella cingulata</i> sob condições de infecção natural em campo, Rio Branco, AC.	44
Tabela 5. Gama de hospedeiros de <i>Mycosphaerella berkeleyi</i> em condições de infecção natural com sintoma de mancha-foliar em Rio Branco, AC.	53
Tabela 6. Gama de hospedeiros de <i>Athelia rolfsii</i> em condições de infecção natural com sintoma de queima e podridão-da-haste, em Rio Branco, AC.	58
Tabela 7. Gama de hospedeiros de <i>Thanatephorus cucumeris</i> em condições de infecção natural em <i>Arachis</i> spp. com sintoma de queima, em Rio Branco, AC.	61

Manual de Identificação de Doenças e Fungos em *Arachis* spp.

Rivaldalve Coelho Gonçalves
Paulo Eduardo França de Macedo
José Henrique Vallim
Josy Soares de Assunção
Sônia Regina Nogueira

1. Introdução

Os fatores abióticos e os fatores bióticos que interagem com os genótipos das cultivares de plantas, principalmente aquelas já lançadas e recomendadas, podem levar à inviabilidade de manutenção da sua recomendação e cultivo para a finalidade proposta. Quando ocorre esse fato, os responsáveis pelo produto tecnológico devem estar atentos para a sua retirada de recomendação, substituição ou provimento do suporte tecnológico que garante a permanência da tecnologia.

Se plantas são prejudicadas por fatores abióticos ou patógenos, e mesmo por algumas toxinas de insetos, costuma-se dizer que estão doentes (AGRIOS, 1969). Qualquer que seja a doença, deve ser estudada quanto as suas causas, seus sintomas e métodos de controle. No

caso de doenças abióticas, as disciplinas Fisiologia Vegetal, Climatologia e Ciência do Solo apresentam as bases e os fundamentos necessários para os estudos científicos que podem resolver os problemas de pesquisa relacionados a esse tema, sobretudo quando se trata da detecção de substâncias indicadoras de estresse fisiológico nas células das plantas. Até o presente momento, poucos estudos existem no Brasil sobre doenças abióticas em *Arachis spp.* Nesse ponto, é importante frisar que, embora alguns estudiosos utilizem o termo estresse para se referir a doenças, essa é uma abordagem errônea, pois estresse é um sintoma de doença e não uma doença propriamente dita. Assim, estresse é condição e não doença. Diferentes doenças causadas por diferentes agentes abióticos podem ter como principal sintoma um mesmo tipo de estresse, a exemplo do acúmulo de agente oxidante nas células das plantas (KENNELLY et al., 2012; INZÉ; MONTAGU, 1995).

Um grupo de agentes bióticos que pode interferir significativamente de modo negativo na população e na produtividade das plantas de interesse humano é as plantas parasitas e as plantas daninhas que tanto prejuízo causam à agricultura, mas esse interessante problema de pesquisa com grande significado para o cultivo de *Arachis spp.*, e para a agricultura em geral, fica a cargo dos fitotecnistas e outros profissionais que se dedicam ao assunto.

Por outro lado, as doenças bióticas das plantas causadas por patógenos, a exemplo de nematoides, protozoários, fungos, bactérias, fitoplasmas, vírus, viroides e virusoides, têm recebido considerável esforço de pesquisa e ações de defesa vegetal dada as perdas econômicas que causam. Em *Arachis pintoi* Krapovickas cv. BRS Mandobi, até o momento, foram observadas cinco doenças causadas por fungos (GONÇALVES, 2011) e uma nematose causada por *Meloidogyne spp.* Uma doença causada pelo vírus *Peanut*

mottle virus Kuhn (PeMov) foi relatada em *A. pintoi* na região de Cerrado, no Brasil (ANJOS et al., 1998) e uma nematose causada pela raça 4 de *Meloidogyne javanica* (Treub 1885) Chitwood 1949 (CARNEIRO et al., 2003) foi relatada na espécie *A. pintoi* no Paraná. Posteriormente, três espécies de *Meloidogyne* (nematóide das galhas) e *Pratylenchus brachiurus* (Godfrey) Filipjev & S. Stekhoven (nematóide das lesões) foram detectadas em diferentes espécies de *Arachis* spp. com sintomas de galhas e lesões nas raízes em Rio Branco, AC (GONÇALVES et al., 2013). Em 2014, *M. javanica* foi confirmada em raízes sem galhas de *A. pintoi* cv. Belmonte em Rio Branco, AC, enquanto em *A. pintoi* cv. Amarillo foi detectada *Meloidogyne* spp. nesse mesmo município. Além dessas doenças, Argel (1994) cita a ocorrência de um fitoplasma associado ao sintoma de folhas pequenas no acesso CIAT18748 de *A. pintoi* em San Isidro.

O trabalho de clínica em plantas para o diagnóstico é fundamental no exercício da profissão de Fitopatologia, nas atividades de ensino, de pesquisa e extensão, sobretudo em estudos de epidemiologia e controle de doenças. Há certa confusão no uso do termo clínica, o qual se refere à ação investigativa que pode ser feita em qualquer local, inclusive em um laboratório com ensaios credenciados, muitas vezes denominado clínica.

No Brasil, diversas publicações em língua portuguesa estão disponíveis para o trabalho de clínica fitopatológica; algumas mais abrangentes e outras específicas por cultura, a exemplo das seguintes literaturas: Identificação e controle de doenças na cultura do milho (SABATO; PINTO; FERNANDES, 2013), Controle de doenças de plantas: fruteiras (ZAMBOLIM et al., 2002), Controle de doenças de plantas: hortaliças (ZAMBOLIM; VALE; COSTA, 2000) e Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas (KIMATI et al., 2005). Além dessas publicações, foram desenvolvidos programas de

computador e livros digitais com fotografias de sintomas e o nome de patógenos mais comuns, como o Programa Diagnóstico Virtual (EMBRAPA, 2010), o Manual de identificação de doenças do algodoeiro (SARAN, 2014a) e o Manual de identificação de doenças de soja (HENNING et al., 2005; SARAN, 2014b).

Contudo, nenhum manual destinado à identificação de doenças de plantas forrageiras do gênero *Arachis* está disponível até o momento. Desse modo, neste documento são apresentadas as informações de doenças e fungos que já foram constatados no Acre e em outros locais no Brasil, com uma abordagem teórica e prática, de modo a contribuir para o diagnóstico de doenças em *Arachis spp.* e para o reconhecimento de fungos fitopatogênicos. Espera-se com esta publicação disponibilizar o conhecimento na forma mais didática possível para uso em salas de aula e no campo. Com os conhecimentos adquiridos até então foi possível elaborar esta publicação que tem o propósito de ser uma fonte de consulta para a atividade de clínica fitopatológica, estudos epidemiológicos ou até mesmo estudos de ecologia de fungos.

2. Fungos e doenças de plantas

Os termos fungos e doenças de plantas são conhecidos da humanidade há milhares de anos e aparecem em livros dos mais antigos possíveis, mesmo antes da clássica discussão científica sobre a origem biótica ou abiótica da vida. Esses relatos mostram que os fungos são agentes vivos que diminuem a produção de alimentos, ameaçam a humanidade e requerem medidas de controle. O modo de nutrição dos fungos por absorção os obriga a decompor a matéria orgânica para obter alimento e, em muitos casos, parasitar as células vivas de plantas pelo mesmo motivo

biológico. Portanto, o parasitismo é condição fundamental para a sobrevivência de muitos fungos, principalmente os fungos parasitas obrigatórios que absorvem os nutrientes notadamente a partir de células vivas dos hospedeiros (AGRIOS, 1969). Outros, no entanto, atuam apenas decompondo a matéria orgânica morta e por isso são chamados de fungos saprófitas ou decompositores.

A estratégia do parasitismo fúngico, conseguida pela evolução na relação com seus hospedeiros, levou a humanidade a se deparar com um grande desafio no caso dos agroecossistemas e sistemas florestais principalmente. Nestes, os fungos encontram ambiente propício a sua multiplicação e interferem na produção vegetal. Essa interferência se dá pelo processo denominado doença de planta, ou seja, qualquer anormalidade fisiológica ou estrutural deletéria ao corpo da planta ou a um de seus órgãos (AGRIOS, 1969). Desse modo, conhecer bem os aspectos botânicos e ecológicos da planta com que se está trabalhando é parte fundamental para o diagnóstico de uma doença.

Assim, conhecer bem a planta e quais fungos podem atacá-la é essencial para o diagnóstico de doenças de amendoim forrageiro. A publicação *Biology and agronomy of forage Arachis* editada por Kerridge e Hardy (1994) é uma boa fonte para iniciar os estudos sobre *Arachis spp.* Em amendoim forrageiro, o porte baixo da planta é natural e não pode ser confundido com o sintoma de nanismo, por exemplo, no caso de plantas infectadas com vírus ou com deficiência mineral. No entanto, a partir do referencial de altura de plantas saudáveis o profissional ou o produtor pode reconhecer se uma planta está ou não com nanismo. Outro exemplo se refere à cor da folhagem, uma vez que o amendoim forrageiro apresenta normalmente folhagem verde, folhas amareladas ou cor de ferrugem são sintomas

de doenças. Plantas com folhas prateadas geralmente sofreram injúrias no limbo foliar, decorrentes da ação de insetos ou artrópodos (JANINI et al., 2010).

Com o objetivo de ampliar o acesso à informação que possa colaborar nas atividades de clínica fitopatológica, são apresentados dados sobre a morfologia de *A. pintoi* publicados por Krapovickas e Gregory (1994). A planta de amendoim forrageiro é herbácea, estolonífera e perene. Apresenta raízes pivotantes fortes, sem alargamentos, a partir da coroa mais velha, e uma densa massa de estolões e rizomas até a profundidade de 20 cm a 40 cm. As hastes são retas no início e prostadas posteriormente, são cilíndricas apresentando cerdas rígidas caducas e raízes adventícias saindo dos nós. As hastes se elevam a cerca de 20 cm ou mais do solo. As folhas são do tipo composta e possuem quatro folíolos em filotaxia alternada. A borda dos folíolos é inteira, não recortada, e ciliada. As estípulas são parcialmente fundidas ao pecíolo e medem 10 mm a 15 mm de comprimento x 3 mm de largura. Há dois tipos de folíolos: os distais ou apicais que têm a forma obovada e os proximais ou basais que têm a forma oblonga-oval. Os folíolos apicais medem 50 mm de comprimento x 32 mm de largura e são obtusos no ápice e levemente cordatos na base. Os folíolos basais medem 45 mm de comprimento x 28 mm de largura. A superfície superior dos folíolos é lisa e verde-escura enquanto a superfície inferior é pubescente. Os pecíolos medem 6 cm ou mais de comprimento e são canaliculados com poucas cerdas na base. As ráquis medem 10 mm a 15 mm de comprimento, são canaliculadas e têm poucas cerdas na base. As flores são individuais e saem de racimos axilares, são 4 a 5 flores por inflorescência, medem 12 mm a 17 mm e são amarelas, em variado grau do quase laranja até o bege. Na extremidade do “peg” forma-se uma vagem contendo normalmente uma semente, algumas vezes duas. Em alguns casos, há a formação de uma vagem ao

longo da extensão do peg, a qual tem apenas uma semente. As vagens que protegem a semente são reticuladas e medem 10 mm a 14 mm x 6 mm a 8 mm de diâmetro. As sementes são de cor marrom-clara, medem 8 mm a 11 mm de comprimento x 4 mm a 6 mm de diâmetro e têm massa de 0,11 g a 0,20 g. Uma informação também relevante é que nas raízes podem ser encontrados nódulos de rizóbio que se desprendem facilmente com os dedos e podem ser confundidos com galhas de nematoides do gênero *Meloidogyne*.

3. Fungos em sementes, folhas e hastes de *Arachis* spp.

Em análise de um lote de sementes de *A. pintoi* feita no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Acre, em Rio Branco, AC, foram detectados os fungos *Rhizopus stolonifer* (Enrenb.) Vuill, *Aspergillus niger* Tieg. e *Fusarium oxysporum* Schltdl. Em estudo realizado em Goiás, foi observado que os fungos *Fusarium* spp. e *Rhizoctonia solani* Kuhn estavam presentes com alta incidência em sementes de amendoim forrageiro (CHARCHAR et al., 2004). Além desses, foram detectados em menor incidência os fungos: *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Chaetomium* spp., *Cladosporium* spp., *Curvularia* spp., *Gliocladium* spp., *Mucor* spp., *Penicillium* spp., *Periconia* spp., *Phomopsis* spp. e *Trichoderma* spp. (CHARCHAR et al., 2004). Muitos desses fungos são patógenos de sementes que podem afetar significativamente o estabelecimento de plantas no campo reduzindo o estande inicial. Fungos de sementes podem estar tanto dentro dos tecidos, ou na superfície da semente na forma de estruturas reprodutivas, esporos, hifas, clamidósporos, microescleródios e escleródios. Lotes de sementes podem conter inóculo suficiente para desencadear epidemias

severas ou brandas que acabam por onerar a produção, ou mesmo inviabilizá-la ao longo do tempo e disseminar o patógeno a longa distância. Desse modo, estudos posteriores de patologia de sementes de *A. pintoi* devem embasar as decisões sobre o tratamento e a padronização de qualidade para a certificação de sementes. Todos os fungos encontrados em *Arachis spp.*, durante o trabalho realizado em Rio Branco, AC (10°1'43.79"S, 67°42'22.16"O), têm como característica a possibilidade de transmissão pelas sementes e estão sumarizados na Tabela 1.

Observa-se que a incidência dos fungos é variável entre os genótipos. Em condições de infecção natural, alguns genótipos não apresentavam doenças mesmo em ambiente favorável com presença de inóculo e sem barreira entre as parcelas. Contudo, é importante monitorar a incidência de doenças por genótipo por um período maior e até realizar inoculações em condições controladas visando detectar alguma fonte de resistência genética.

Tabela 1. Frequência de ocorrência de fungos em amostras de *Arachis* spp. coletadas em Rio Branco, Acre.

Espécies	Número de amostras	<i>Puccinia arachidis</i>	<i>Glomerella cingulata</i>	<i>Mycosphaerella berkeleyi</i>	<i>Tanathephorus cucumeris</i>	<i>Athelia rolfsii</i>
<i>A. pintoi</i>	65	2	6	7	2	2
<i>A. glabrata</i>	6	1	1	0	0	0
<i>A. repens</i>	25	4	4	4	1	0
<i>A. helodes</i>	1	1	1	1	0	0
<i>A. pintoi</i> x <i>A. repens</i>	3	1	1	1	0	0
<i>A. pintoi</i> x <i>A. pintoi</i>	11	2	2	2	0	0
<i>A. apressipila</i> x <i>A. pintoi</i>	2	0	1	0	0	0
<i>A. vallsii</i> x <i>A. pintoi</i>	1	0	0	0	0	0
Total	114	11	16	15	3	2

4. Técnicas de montagem de lâminas temporárias e registro das informações para o diagnóstico de doença

A operação de montagem de lâminas temporárias para observação de estruturas fúngicas visando à identificação dos fungos pode, de modo geral, ser padronizada para a grande maioria daqueles que são encontrados em *Arachis* spp. Desse modo, são descritos dois métodos de montagem de lâminas para o trabalho de identificação dos fungos que foram encontrados no amendoim forrageiro.

Para identificar *Puccinia arachidis* Spegazzini, *Glomerella cingulata* Stoneman (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Saccardo) e *Mycosphaerella berkeleyi* W. A. Jenkins (*Passalora personata*) (Berk. & M.A. Curtis) S.A. Khan & M. Kamal., primeiramente, são realizadas observações nos tecidos afetados com microscópio estereoscópico (lupa) no aumento de 50x para a detecção das estruturas reprodutivas de cada fungo. Em seguida são feitos cortes à mão livre, com lâmina fina de aço, e lâminas temporárias são montadas com líquido de montagem contendo azul de algodão. Os componentes e as quantidades de cada um no líquido de montagem (Tabela 2) e o método de preparo estão descritos a seguir.

Tabela 2. Composição do líquido de montagem à base de azul de algodão.

Componentes	Quantidades
Azul de algodão a 1% m/v	1 mL a 5 mL
Ácido acético glacial 99% m/v	0 mL a 2 mL
Lactofenol	100 mL

No preparo do líquido de montagem usa-se uma solução de lactofenol feita no próprio laboratório que requer a dissolução de 20 g de fenol na forma de cristais em 20 mL de ácido láctico a 85% m/v, 40 mL de glicerina e 20 mL de água destilada. A solução de azul de algodão ($C_{37}H_{27}N_3Na_2O_9S_3$) também conhecida como azul de metila ou ácido azul é feita pela simples dissolução do corante na forma de pó em água destilada na proporção de 1% m/v. Essas atividades devem ser realizadas dentro de uma câmara de exaustão de gases para evitar contaminação com os produtos durante

o preparo do líquido de montagem. São necessários equipamentos de proteção individual de laboratório, pipetas de vidro, pipeta com ponteira de plástico, vidro âmbar, sistema de filtragem com bomba a vácuo, balança calibrada e espátulas. Esse líquido de montagem serve para ressaltar detalhes das estruturas hialinas observadas, mas nos casos de estruturas naturalmente coradas, o uso apenas do lactofenol é suficiente. A água é também um líquido de montagem que preserva as estruturas, mas rapidamente evapora da lâmina.

Em cada gota de líquido de montagem são colocados até cinco cortes de tecidos de plantas para análise, os quais são cobertos com lamínula transparente medindo 17 mm x 17 mm por 0,13 mm a 0,17 mm de espessura fixada com esmalte. O recolhimento dos esporos de *M. berkeleyi* para observação e mensuração pode ser realizado com mais eficiência utilizando uma gota de água presa na ponteira da pipeta automática de polipropileno. Essa técnica de fluxo e refluxo aplicada de modo a varrer a lesão esporulante aumenta a concentração de esporos na gota e contribui para reduzir o tempo gasto na montagem da lâmina e nas atividades de isolamento do patógeno.

As lâminas de *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk e *Athelia rolfsii* (Curzi) Tu & Kimbrough, ambos na fase anamorfa, devem ser preparadas utilizando o método de micocultura. A técnica de micocultura consiste em preparar uma placa de Petri medindo 90 mm x 15 mm, forrada com papel-filtro molhado contendo uma lâmina de vidro transparente sobre um suporte. Esse material é então autoclavado e, em câmara de fluxo vertical previamente desinfestada, um disco de meio de cultura com o fungo é posicionado no centro da lâmina de microscopia. A placa é colocada em incubadora tipo BOD a 25 °C para que o fungo se desenvolva sobre a lâmina.

Em geral, após um período de 48 a 72 horas é possível realizar a montagem da lâmina, com o líquido de montagem, e fazer as observações, embora em alguns casos seja recomendável esperar um tempo maior. Cuidadosamente, deve-se retirar o disco de cultura com o bisturi ou estilete, aplicar uma gota do líquido de montagem e posicionar a lamínula inclinada deixando-a cair levemente sobre a gota para evitar bolhas. Fungos muito esporulantes devem ser lavados com etanol 70% aspergido na lâmina antes de colocar o líquido de montagem. Aplicar o esmalte em toda a borda da lamínula e levar para observação no microscópio de luz comum até a objetiva de 100x com óleo de imersão.

A seguir observa-se uma micocultura de *Aspergillus flavus* Link utilizando alça em T de polipropileno como suporte (Figura 1A) e itens normalmente usados na montagem de lâminas (Figura 1B).

Fotos: Rivaldaive Coelho Gonçalves

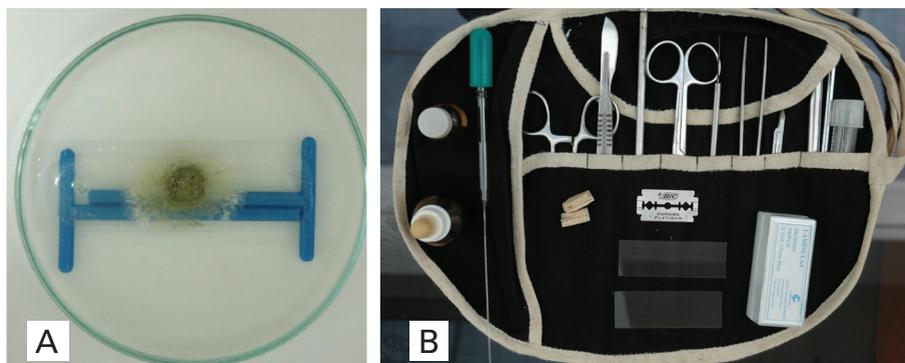
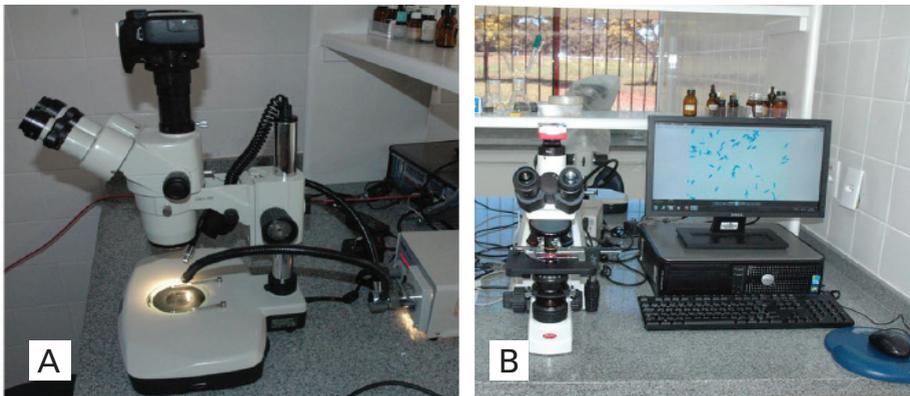


Figura 1. Micocultura em placa de Petri (A) e itens necessários para a montagem de lâminas de microscopia (B).

As medições e o registro das estruturas são importantes para a fase seguinte de análise. Para estruturas relativamente grandes, um microscópio estereoscópico com luz incidente, tendo uma câmera acoplada por um tubo, é o conjunto de equipamento mais seguro

e de baixo custo para registro das imagens (Figura 2A). Esse conjunto câmera + tubo deve ser compatível com o microscópio de luz comum para o registro em fotografia das estruturas menores. Em uma das oculares de cada equipamento deve haver uma lente com régua micrométrica fixa e um retículo de fio móvel deve ser utilizado para as medidas. Tecnologias com programas de computador (Figura 2B) são de custo mais elevado tanto no investimento quanto na manutenção do sistema que deve vir licenciado para uso, mas quando disponível e devidamente calibrado e verificado continuamente, é de grande valia pela maior rapidez na obtenção da resposta de leitura para uma grande maioria de usuários. A qualidade das imagens obtidas varia de acordo com os processadores, a resolução das câmeras e as tecnologias de transmissão de um equipamento para outro.



Fotos: Rivaldive Coelho Gonçalves

Figura 2. Sistema de obtenção de imagens microscópicas com câmera digital SLR (A) e com câmera de vídeo combinada com programa de computador (B).

No caso do uso de câmera digital SLR, os dados podem ser anotados em papel ou digitalizados. Já com o uso de câmera de vídeo combinada com programa de computador, os dados de medidas ficam registrados automaticamente e são salvos em uma planilha, por meio de um clique no mouse. Em ambos os casos de

digitalização, as planilhas devem ser impressas para a segurança dos dados.

5. Descrição das doenças e dos fungos de *Arachis* spp.

5.1. Ferrugem-do-amendoim-forrageiro

A ferrugem-do-amendoim-forrageiro é uma doença causada pelo fungo *P. arachidis*, o qual é um patógeno biotrófico, ou seja, depende de tecidos vivos do hospedeiro para completar seu ciclo de vida. O patógeno na forma de esporos é facilmente dispersado pelo vento e as lesões que causa prejudicam a fotossíntese e a translocação de nutrientes e fotoassimilados. Em *A. pintoí* cv. BRS Mandobi, no Acre, até o momento, essa doença tem baixa incidência e severidade, mas em *A. repens* e *A. glabrata* apresenta alta incidência e é muito severa. A ferrugem-do-amendoim-forrageiro foi relatada no Brasil em *A. hypogaea* L. (HENNEN et al., 1976) e em *A. repens* (RODRIGUES et al., 2006). Há também relato da ocorrência desse fungo em *A. glabrata* no Mato Grosso (HENNEN, 1982). Trata-se de uma doença de grande importância para a produção do amendoim, *A. hypogaea*, que é cultivado no Acre, notadamente no Município de Senador Guiomard. No Acre, a doença foi detectada em quatro espécies de amendoim forrageiro, totalizando 11 diferentes tipos de plantas, inclusive em *A. helodes*, conhecido como amendoim Pingo de Ouro devido à tonalidade amarelo-alaranjada da flor. Em todas as amostras analisadas até o momento, somente em *A. pintoí* cv. Belmonte, foi detectado o teliósporo bicelular, uma única vez, em Rio Branco, AC, o que indica a ocorrência de reprodução sexuada do fungo nesse local. As espécies hospedeiras de *P. arachidis* em condições naturais de

infecção no campo confirmadas em Rio Branco são *Arachis pintoii*, *A. glabrata*, *A. repens* e *A. helodes* (Tabela 3). As demais espécies hospedeiras relatadas na literatura não fazem parte da coleção de plantas de *Arachis* spp. que foi analisada neste estudo.

A doença ocorre na face adaxial e abaxial dos folíolos, inicialmente como pequenas lesões pontuais de pústulas individuais circulares ou ligeiramente alongadas ou agrupadas de cor marrom-clara (Figura 3A e 3B) que coalescem em lesões maiores de cor marrom-escura (Figura 3C). O tecido necrosado é desidratado e morre e o limbo foliar em torno da lesão apresenta halo amarelado perceptível na face adaxial em *A. pintoii* (Figura 3D) e em *A. repens* (Figura 3E). Em seguida, o folíolo atacado seca e cai. As lesões pequenas podem estar dispersas de forma aproximadamente homogênea no limbo em baixa ou alta severidade comprometendo quase toda a área foliolar (Figura 4A e 4B). Os esporos brilham quando vistos sob luz incidente no microscópio estereoscópico com aumento de 50x. Em *A. repens* as pústulas apresentam 0,3 mm a 0,6 mm (RODRIGUES et al., 2006). Por meio de observação dos sinais nos folíolos atacados em microscópio estereoscópico e das estruturas dos fungos em lâminas confeccionadas a partir das pústulas, foi possível estabelecer uma forte associação entre folíolos com sintoma da ferrugem e a presença do fungo *P. arachidis* nas 11 parcelas estudadas.

Fotos: Rivaldely Coelho Gonçalves

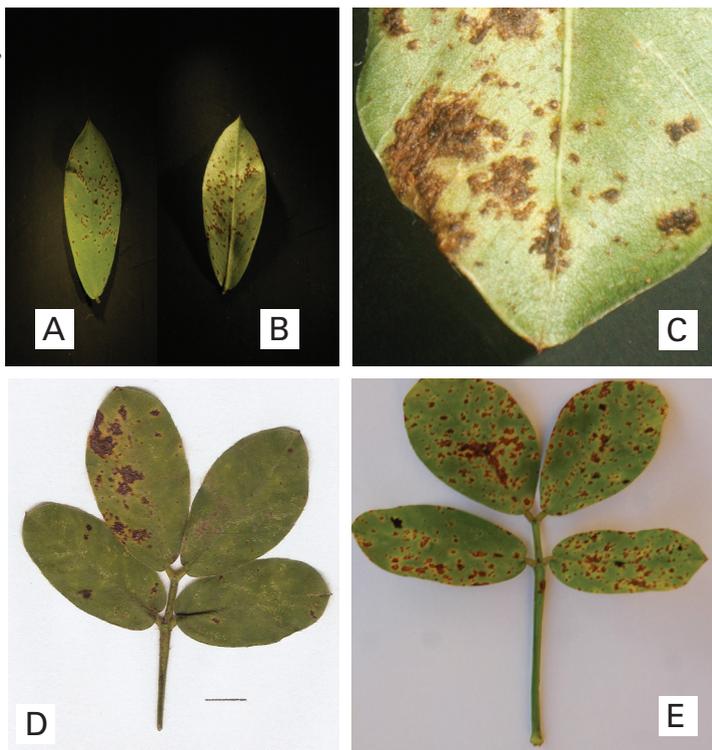


Figura 3. Lesões de ferrugem cor marrom na face adaxial (A) e abaxial (B e C) em folíolos de *Arachis pintoi* e lesões de ferrugem com halo amarelado em *A. pintoi* (D) e em *A. repens* (E).

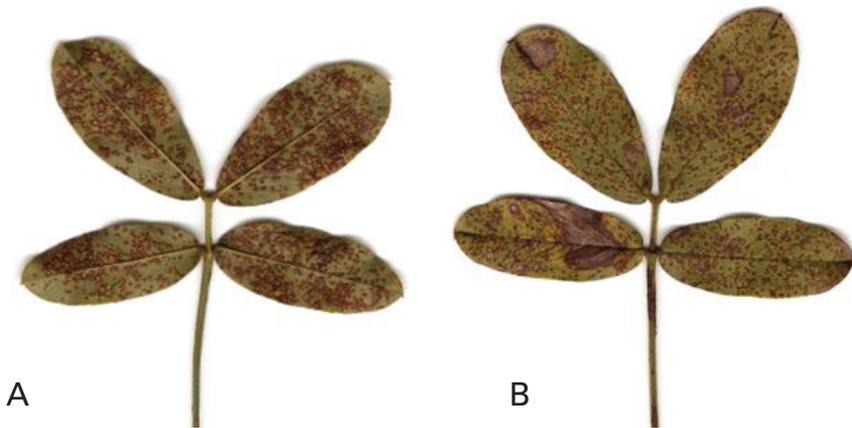


Figura 4. Folhas de *A. repens* com ferrugem-do-amendoim-forrageiro na face abaxial (A), adaxial (B) e no pecíolo (B).

5.1.1. Identificação do fungo *Puccinia arachidis*

As fases de pícnio e écio ainda não são conhecidas na espécie *P. arachidis*. A fase uredo se caracteriza por apresentar urédia anfígena, principalmente na face abaxial da folha (SPEGAZZINI, 1884). As urédias são de cor âmbar-clara quando novas e âmbar-marrom quando maduras, distribuídas ao acaso medindo cerca de 0,3 mm de diâmetro (Figura 5A).

Os uredósporos são unicelulares, elipsoides a piriformes e medem 18–33 μm x 13–25 μm , têm parede espessa e são finamente equinulados na face externa da parede (Figura 5B, 5C e 5D). Quando novos, os uredósporos são hialinos a levemente amarelados, mas tornam-se ocre, vistos ao microscópio de luz comum quando estão maduros. Alguns uredósporos apresentam aparência globosa, medem 5,94 μm de comprimento por 5,28 μm de diâmetro, em média, e muitos apresentam o pedicelo hialino, sobre o qual são produzidos.

A fase de télia se caracteriza por ser morfologicamente semelhante à urédia, mas é usualmente muito escura. Os teliosporos são bicelulares e elípticos, obtusos na parte superior, levemente constrictos no septo ao meio (HENNEN, 1982), medindo 38–42 μm x 14–16 μm , têm parede espessa, lisa externamente e cor castanha, ligeiramente truncados ou atenuados na célula basal, sobre um pedicelo hialino de aproximadamente 50–60 μm de comprimento x 1–5 μm de diâmetro. São hospedeiros do fungo *Puccinia arachidis*: *A. hypogaea*, *A. marginata* Gardner., *A. nambyquarae* Hoehne, *A. prostrata* Benth., *A. glabrata*, *A. repens*, *A. pinto* e *A. helodes* (HENNEN, 1982) e *A. monticola* Krapovickas e Rigoni (HENNEN et al., 1976).

Fotos: Rivaldave Coelho Gonçalves (A, B) e Paulo Eduardo F. de Macedo (C, D)

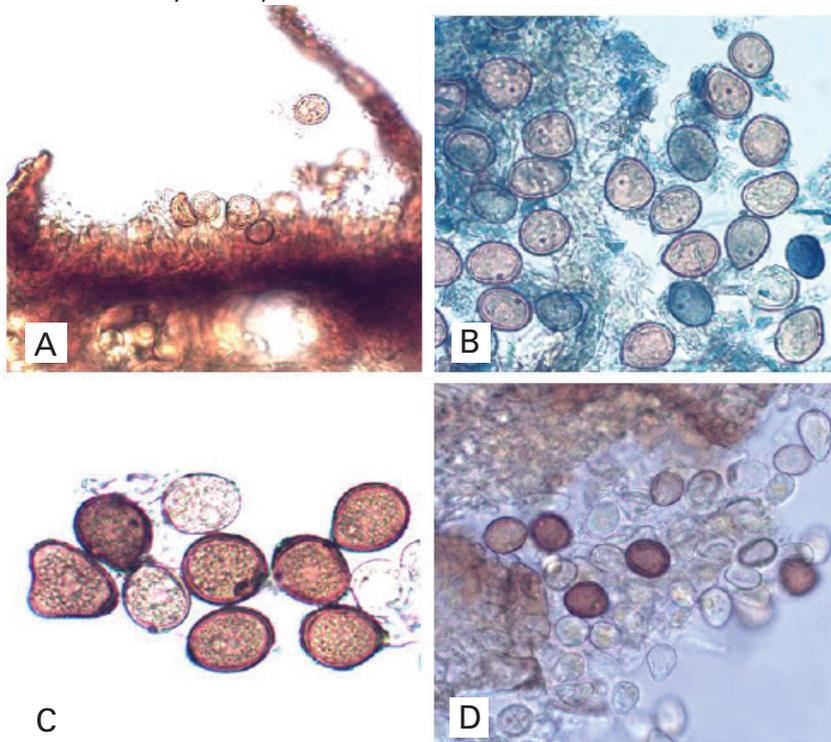


Figura 5. Urédia de *Puccinia arachidis* formada em *A. pinto* cv. BRS Mandobi (A) e uredósporos em diferentes estádios de amadurecimento (B, C e D).

5.1.2. Isolamento de *Puccinia arachidis*

O fungo *P. arachidis* não é cultivado em meio de cultura e seu isolamento pode ser obtido utilizando-se um hospedeiro suscetível. Para tanto, devem ser confeccionadas baias, nas quais são colocadas as plantas que são mantidas sobre bancadas em telados ou casa de vegetação. Em cada baia é colocada uma planta sadia de hospedeiro suscetível para ser inoculada com esporos de uma única pústula da ferrugem. Após a atomização da suspensão de esporos nas folhas, a planta inoculada é mantida no escuro por 24h em ambiente com alta umidade relativa do ar a 25 °C. Posteriormente, a planta é conduzida nas baias em ambiente fresco até a formação de novas pústulas no hospedeiro. É esperado encontrar o fungo com urédias em todos os genótipos listados na Tabela 3, no Município de Rio Branco, AC.

Tabela 3. Gama de hospedeiros do fungo *Puccinia arachidis* causando ferrugem em condições de infecção natural no campo em Rio Branco, AC.

Número do acesso no BAG da Embrapa Acre	Código do acesso no BAG da Embrapa Acre	Nome científico	Sintoma	Sinal	Estrutura	
					Urédia	Télia
5	V 13634	<i>A. repens</i>	+	+	+	-
9	G 12787 x Nc 1579	<i>A. pintoii</i> x <i>A. repens</i>	+	+	+	-
10	V 13468 x V 13167	<i>A. pintoii</i> x <i>A. pintoii</i>	+	+	+	-
12	V 13468 x G 12787	<i>A. pintoii</i> x <i>A. pintoii</i>	+	+	+	-
18	Nc 1579	<i>A. repens</i>	+	+	+	-
38	Campo Grande	<i>A. glabrata</i>	+	+	+	-
61	Belmonte	<i>A. pintoii</i>	+	+	+	+
94	V 6673	<i>A. repens</i>	+	+	+	-
109	V 13282	<i>A. pintoii</i>	+	+	+	-
113	Pingo de Ouro = V 15230	<i>A. helodes</i>	+	+	+	-
128	V 15422	<i>A. repens</i>	+	+	+	-

+: presença; -: ausência.

5.1.3. Preservação de esporos de *Puccinia arachidis* durante o armazenamento

A preservação de uredósporos de *P. arachidis* pode ser conseguida durante o armazenamento em geladeira a cerca de 5 °C, utilizando tubo de ensaio fechado com tampa de plástico e forro de teflon. Para tanto, uma grande quantidade de esporos deve ser colhida com coletor de esporos e o tubo deve ser fechado hermeticamente para não haver dessecação das células.

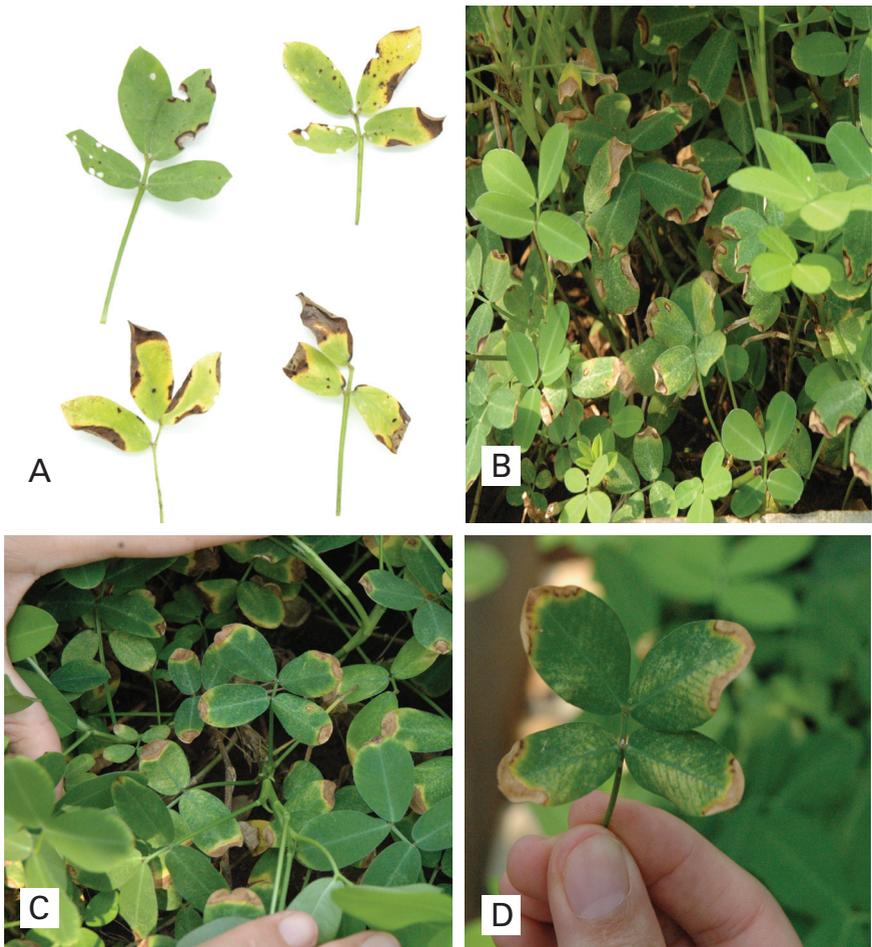
5.2. Mancha-foliar-de-colletotrichum-do-amendoim-forrageiro

A mancha-foliar-de-colletotrichum-do-amendoim-forrageiro (MFCAF) foi observada em amostras de *A. pintoi* cv. Belmonte colhidas em Rio Branco no Acre (10°1'43.79"S, 67°42'22.16"O), em condições de infecção natural, apresentando porções de tecido foliar necrosadas com abundante produção de acérvulos, setas e esporos típicos do gênero *Colletotrichum*. Nem todos os isolados obtidos de *A. pintoi* com sintomas da doença são capazes de infectar e causar a antracnose no hospedeiro em condições controladas, havendo registro de que numa população de 183 indivíduos testados, apenas 83 foram patogênicos a *A. pintoi* (KELEMU; MUÑOS; RODRIGUES, 2000). Em condições de infecção natural, essa doença ocorre também em *A. pintoi* e *A. repens* no Brasil, no Estado de Goiás (CHARCHAR et al., 2004).

O fungo é isolado frequentemente a partir de folhas de plantas com sintomas, sendo identificado por morfologia comparativa como *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. in Penz., o qual se refere ao teleomorfo *G. cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk. O fungo é disseminado principalmente por sementes, partes vegetativas das plantas, enxurrada e respingos de água.

5.2.1. Sintomas e sinais da doença mancha-foliar-de-colletotrichum-do-amendoim-forrageiro

A doença se caracteriza principalmente por lesões com o formato de “V” invertido, no sentido ponta para a base do folíolo atacado devido ao avanço rápido da lesão na nervura principal em sentido descendente (Figura 6A). No entanto, lesões foliares de outros formatos com bordos arredondados também ocorrem (Figura 6A e 6B). Em geral, em condições de campo, telado, casa de vegetação ou viveiro, observa-se em muitos genótipos um halo clorótico amarelado em torno das lesões (Figura 6C). A borda das lesões é escura e a parte mais velha das lesões, em geral, é marrom-clara (Figura 6C e 6D). Muitas doenças causadas por *Colletotrichum* ou *Glomerella* são denominadas de antracnose. A denominação mancha-foliar em vez de antracnose decorre da necessidade de orientar a análise clínica e evitar a adoção de termo genérico. Originalmente, o termo antracnose foi posto para caracterizar uma doença da videira causada por *Elsinöe ampelina* Schear (anamorfo: *Sphaceloma ampelinum* de Bary) distinguindo-a do carvão-de-cereais, pois à época, ambas as doenças eram denominadas na França de “charbon” (JENKINS, 1933). A extensão do uso do termo antracnose para toda doença em que o agente etiológico é um fungo com estágio conidial semelhante a *Gloeosporium* Primer, não necessariamente do gênero *Colletotrichum*, resultou em perda de precisão na informação. A presente doença é mais bem-entendida como uma mancha foliar de *Colletotrichum* do inglês “Colletotrichum leaf spot disease” (FU et al., 2013), embora ainda haja quem prefira caracterizar mancha foliar apenas como uma fase da doença previamente denominada antracnose (HOWARD; ALBREGTS, 1983).



Fotos: Rivadulve Coelho Gonçalves

Figura 6. Foliólos de amendoim forrageiro com sintomas típicos da doença MFCFAF (A, B, C e D) e foliόlos com MFCFAF e injúria de inseto (D).

Os sinais do fungo podem ser vistos ao microscópio estereoscópico, observando-se acérvulos com setas pretas que são estruturas reprodutivas características do fungo causador da doença. Ao microscópio de luz comum são observadas as setas pretas agrupadas e os esporos cilíndricos, arredondados nas pontas (Figura 7A e 7B). Em meio de cultura, composto de batata dextrose ágar, o fungo

produz esporodóquios, sobre os quais, milhões de conídios se formam, constituindo uma massa cor salmão (Figura 8A e 8B). Os esporos germinam e formam estruturas de penetração denominadas apressórios (Figura 8C e 8D).

Fotos: Paulo Eduardo França de Macedo

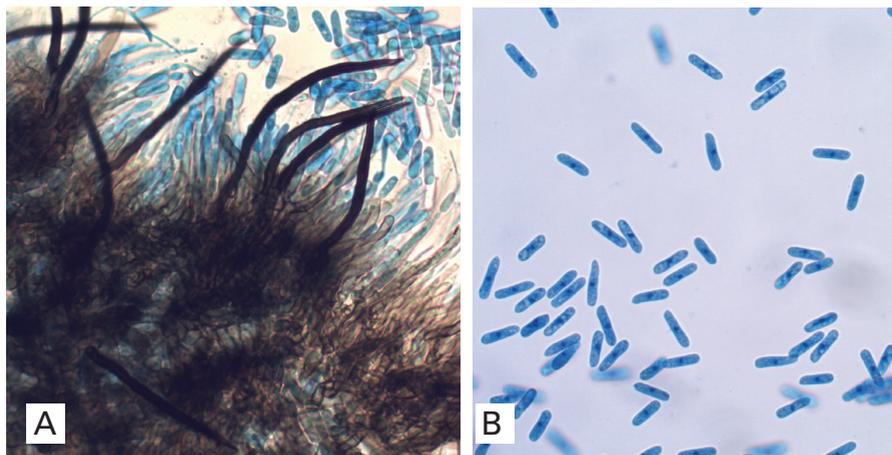
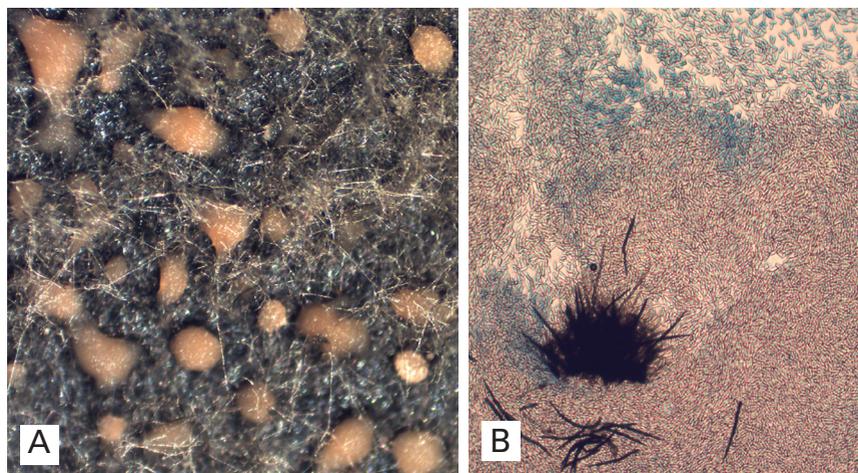
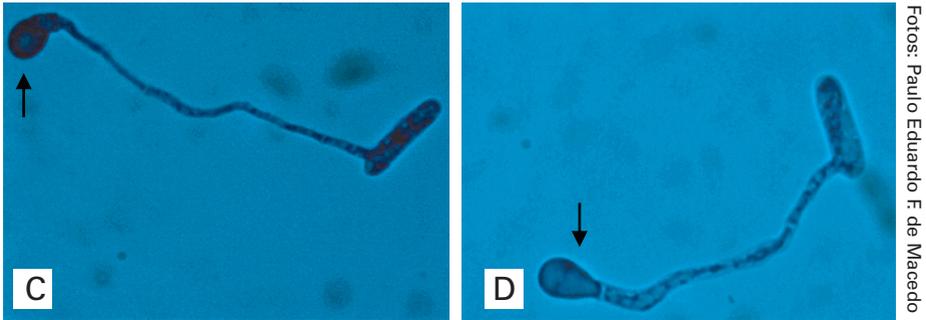


Figura 7. Acérvulos sinemoides com setas pretas e conidióforos (A) e conídios cilíndricos (A e B) do fungo *G. cingulata* oriundos de folhas com doença.

Fotos: Paulo Eduardo França de Macedo





Fotos: Paulo Eduardo F. de Macedo

Figura 8. Esporodóquios produzidos pelo fungo *G. cingulata* em meio de cultura (A e B) e conídios germinados com apressórios (setas) (C e D).

5.3. Antracnose-da-haste-do-amendoim-forrageiro

A antracnose-da-haste-do-amendoim-forrageiro é causada pela mesma espécie de fungo apresentada anteriormente, mas ocorre em órgão distinto da doença mancha-foliar-de-colletotrichum-do-amendoim-forrageiro.

Argel e Pizarro (1992) relataram lesões escuras na haste de *A. pintoi* na Colômbia, causadas por *Colletotrichum* spp. No Brasil, a antracnose foi relatada em *Arachis pintoi* no ano de 1995 no Estado de Goiás (CHARCHAR; PIZARRO, 1995). Posteriormente, a doença foi relatada como antracnose, na Colômbia e, devido à importância crescente para o cultivo de *A. pintoi*, a diversidade genética e patogênica de *Colletotrichum gloeosporioides* foi estudada (KELEMU; MUÑOS; RODRIGUES, 2000).

Os sintomas e sinais da antracnose-da-haste-do-amendoim-forrageiro são importantes para a diagnose da doença, sendo visíveis a olho nu ou apenas com uma lupa de bolso.

Na haste das plantas atacadas naturalmente no campo, o fungo causa pequenas lesões elípticas que evoluem para microcancros elipsoidais. Algumas lesões são longilíneas e longas de cor marrom-clara a escura contendo estruturas

reprodutivas do patógeno (Figura 9A, 9B e 9C). A doença provoca a morte dos tecidos de condução de seiva e a murcha permanente da porção posterior à lesão na planta, quando a lesão anela a haste. Nos tecidos colonizados, a epiderme fica enrugada e seca (Figura 9D). Em seguida, o fungo produz acérvulos, com setas pretas, e nessas estruturas reprodutivas é produzida grande quantidade de esporos, liberados em massa para o ambiente. Os acérvulos com setas agrupadas podem ser vistos e reconhecidos facilmente em microscópio estereoscópico com aumento de 50x, ou em microscópio de luz comum (Figura 10A e 10B).

Fotos: Rivadalve Coelho Gonçalves

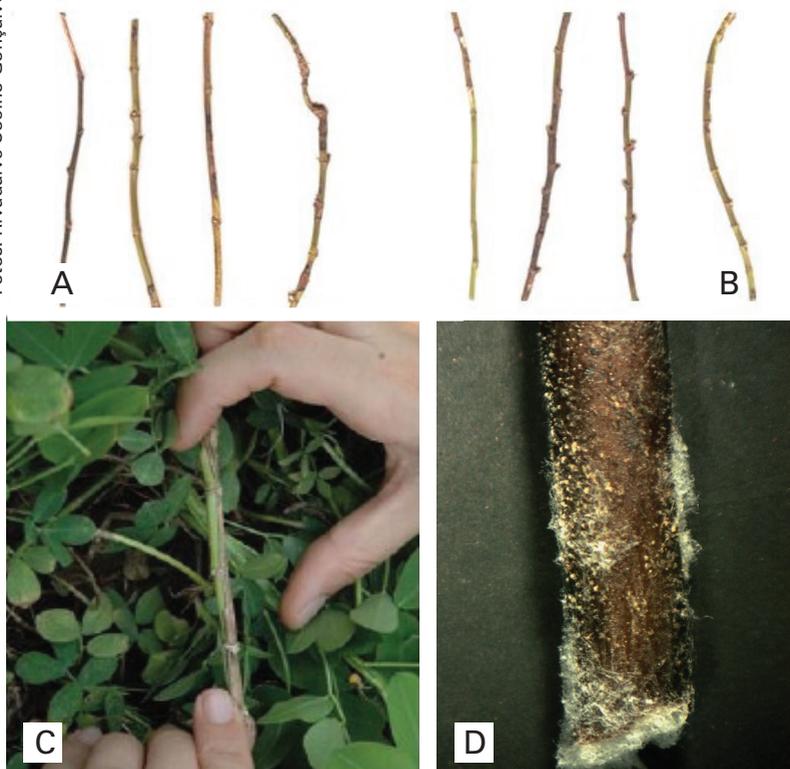
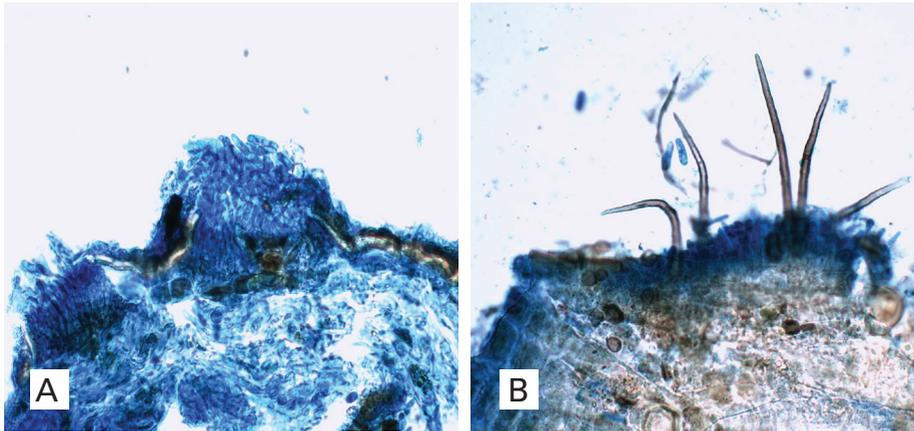


Figura 9. Estolões com sintomas de antracnose-da-haste-do-amendoim-forrageiro com presença de lesões longilíneas (A, B e C) e massa de esporos em acérvulos (D).



Fotos: Paulo Eduardo França de Macedo

Figura 10. Acérvulos de *G. cingulata* (A), agente causal da antracnose-da-haste-do-amendoim-forrageiro, evidenciando a presença de setas negras e conídios do patógeno (B).

5.3.1. Dados para identificação do anamorfo de *Glomerella cingulata*

A identificação de *G. cingulata* tem sido realizada no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Acre por meio da análise do anamorfo *C. gloeosporioides* presente nos tecidos do hospedeiro. São realizadas observações nos tecidos afetados com microscópio estereoscópico no aumento de 50x para a detecção das estruturas acérvulo, setas e massa de esporos do fungo, à semelhança dos demais fungos que apresentam esporulação nos tecidos do hospedeiro. Em seguida são feitos cortes à mão livre com lâmina fina de aço e são montadas lâminas temporárias com líquido de montagem contendo azul de algodão, conforme mencionado anteriormente. Com essas observações é possível anotar as seguintes características, utilizando o sistema binário: acérvulo presente = 1, ausente = 0; seta presente = 1, ausente = 0; conídio presente = 1, ausente = 0.

Para observações de características macromorfológicas *in vitro*, as placas de Petri com culturas monospóricas são mantidas em BOD à temperatura de 20 °C, fotoperíodo de 12h com duas lâmpadas de luz branca, modelo universal luz do dia, 20W, e duas de luz negra, modelo F20T10/BLB, 20W, por 10 dias. Ao final do décimo dia, as colônias são medidas em diâmetro perpendicular com régua metálica com precisão de 1,0 mm e caracterizadas quanto à cor e aspecto da borda e da esporulação, utilizando-se como base um quadro de cores elaborado para essa atividade e uma descrição do padrão da colônia. Padrão de cor da colônia: 1 – cinza escurecendo para o centro, 0 – cinza escurecendo para o centro e alaranjado para a borda; forma da borda da colônia: 1 – regular, 0 – irregular; esporulação: 1 – presente, 0 – ausente; cor da esporulação: 1 – laranja, 0 – cinza; posição relativa das estruturas reprodutivas na colônia: 1 – concentrada no centro da colônia, 0 – espalhada pela colônia; forma do micélio: 1 – aéreo cotonoso uniforme, 0 – não aéreo uniforme; anéis concêntricos cinza-escuros na colônia: 1 – presente, 0 – ausente.

Para observação dos conídios, raspa-se uma pequena parte de esporulação na massa alaranjada de esporos, deposita-se essa massa em uma lâmina de vidro contendo uma gota de líquido de montagem preparado conforme descrito anteriormente e observa-se ao microscópio. Para observação de apressórios, adicionam-se 10 mL de água destilada estéril na placa e com auxílio de alça de Drigalski realiza-se a raspagem obtendo uma suspensão de conídios. A suspensão é diluída para concentração de aproximadamente 3×10^3 conídios.mL⁻¹ para proporcionar a visualização individual de cada apressório. Uma gota de 40 µL da suspensão é depositada em lâmina de vidro previamente esterilizada e colocada em caixa tipo Gerbox[®] com papel-filtro umedecido para manutenção de câmara úmida. As caixas Gerbox[®] são

colocadas em incubadora tipo BOD à temperatura de 20 °C, fotoperíodo de 12 horas com luz branca e luz negra, tal como citado. Após 24 horas, adiciona-se uma gota de solução do líquido de montagem de lâminas e realiza-se a observação quanto à formação, morfologia, dimensão e fotografam-se os apressórios. Para cada indivíduo ou isolado são observados e medidos 30 conídios e 30 apressórios.

O diâmetro médio e o comprimento médio dos conídios de *C. gloeosporioides* encontrado em *A. pintoi* estão na faixa considerada para a espécie, bem como os apressórios, que são arredondados a ovais.

Além das características apontadas anteriormente, as características de *C. gloeosporioides* com resposta positiva que devem ser marcadas com o numeral 1 para efeito de análise estatística pelo sistema binário são: conídio cilíndrico, elipsoidal, levemente clavado ou fusiforme, geralmente não curvado; conídio cilíndrico, elipsoidal ou levemente clavado; conídio com comprimento de 10–23 µm e diâmetro de 3–6 µm, geralmente de parede fina; escleródios geralmente ausentes; clamidósporos intercalares geralmente ausentes ou não escuros; conídio 10–21 µm x 4–6 µm. As características com resposta negativa são: conídio falcado ou semilunar; conídio 20–30 µm x 3–5 µm; especificidade nos hospedeiros *Leguminosae*, *Spinacia*, *Allium cepa* L., *Capsicum*; conídio 22–40 µm x 5–7 µm; cana-de-açúcar; conídio levemente fusiforme ou irregular, geralmente com extremidades atenuadas; conídio 14–24 µm x 4–6 µm em *Hedera helix* L.; conídio 8–15 µm x 3–4 µm, em vários hospedeiros ou específico para *Pinus*; conídio 18–30 µm x 6–8 µm, de parede espessa; geralmente apresentam escleródios escuros, conídios cilíndricos, 16–24 µm x 3–5 µm, na batata e em outra *Solanaceae* ou solo; clamidósporos intercalares presentes, muitas vezes formando manchas escuras, conídios de 16–18 µm x 3–4 µm, em *Digitalis*;

conídio cilíndrico, muitas vezes levemente atenuado nas extremidades e, em parte, levemente curvado, 14–22 μm x 3–4 μm , no *Linum*; específicos dos hospedeiros *Phaseolus*, *Trifolium*, *Medicago* e outros legumes; *Cucurbitaceae*; *Coffea*; *Capsicum*; *Fragaria*; *Malvaceae*; *Carica*; *Nymphaeae*; *Musa* e *Salix*. Com esses dados tabelados, é possível fazer a identificação utilizando a chave taxonômica sinóptica publicada em Von Arx (1981) ou por análise de agrupamento.

5.3.2. Isolamento de *Glomerella cingulata*

Em alguns casos, torna-se relevante isolar um ou vários indivíduos do fungo para estudos ou mesmo para a comprovação durante a diagnose. Para isolar o fungo, lavar com água e detergente neutro os folíolos ou partes de estolões que apresentam sintomas de alguma das doenças. A seguir, cortar o tecido na interface do tecido verde com tecido lesionado e proceder à desinfestação com etanol 70% por 1 minuto, seguida da imersão em solução aquosa de NaOCl a 12.500 ppm por 3 minutos. Em seguida, lavar as amostras três vezes com água destilada estéril, retirar os fragmentos com pinça flambada e colocar sobre o meio de cultura em placas de Petri. O meio pode ser BDA (batata dextrose ágar) a 3,9%, Merck, Himedia, Oxoid ou outra marca de boa qualidade e cloranfenicol a 100 ppm. Pode-se também preparar o BDA a partir do caldo de batata (*Solanum tuberosum* L.), dextrose e ágar conforme descrito na literatura (ZAUZA; ALFENAS; MAFIA, 2007). Todo o procedimento de isolamento deve ser feito em câmara de fluxo laminar vertical contendo luz ultravioleta germicida. O preparo da câmara de fluxo deve ser cuidadoso fazendo-se a limpeza das paredes internas com etanol 70% seguida da exposição da superfície interna da câmara à luz germicida por 15 minutos. A luz ultravioleta germicida é mutagênica, portanto, não transitar próximo à câmara enquanto estiver ligada. Outro procedimento para o isolamento do fungo

pode ser aquele adotado por Kelemu; Badel; Moreno (1996) utilizando o meio de cultura OMA (oat meal agar) para depositar os pequenos pedaços de tecido vegetal com antracnose previamente desinfestados com etanol 70% por 2 minutos e NaOCl a 1% por 3 minutos, seguido de três lavagens em água destilada estéril. As colônias podem ser variáveis no aspecto macromorfológico, mas uma maior prevalência de colônias cotonosas de cor branco-hialina quando novas e cinza do centro para a borda com esporulação cor salmão (Figura 11A e 11B), à medida que vão se tornando mais velhas, é indicativo de sucesso na atividade de isolamento do fungo.

Na Tabela 4 constam os genótipos dos quais foram obtidos os indivíduos de *G. cingulata* estudados neste trabalho com os códigos dados aos isolados, indicando a gama de hospedeiros do fungo em condições de infecção natural no campo com vistas a dar um indicativo para a identificação desse fungo em *Arachis* spp.

Tabela 4. Gama de hospedeiros de *Glomerella cingulata* sob condições de infecção natural em campo, Rio Branco, AC.

Número do acesso no BAG da Embrapa Acre	Nome do acesso no BAG da Embrapa Acre	Nome científico	Código do fungo
61	BRS Belmonte	<i>A. pintoi</i>	CMEA 137
50	-	<i>A. pintoi</i>	CMEA 138
53	V 6740	<i>A. pintoi</i>	CMEA 139
109	V 13282	<i>A. pintoi</i>	CMEA 140
116	Epagri Ituporanga	<i>A. pintoi</i>	CMEA 141
133	JK 3	<i>A. pintoi</i>	CMEA 142
35	W 1005 = W 200	<i>A. repens</i>	CMEA 143
25	W 215	<i>A. repens</i>	CMEA 144
26	W 788	<i>A. repens</i>	CMEA 145
92	V 6674	<i>A. repens</i>	CMEA 146
40	-	<i>A. glabrata</i>	-
113	Pingo de Ouro = V 15230	<i>A. helodes</i>	CMEA 147
10	V 13468 x V 13167	<i>A. pintoi</i> x <i>A. pintoi</i>	CMEA 148
12	V 13468 x G 12787	<i>A. pintoi</i> x <i>A. pintoi</i>	CMEA 149
73	VMc 96 x 7	<i>A. pintoi</i> x <i>A. repens</i>	CMEA 150
129	GKP 10002 x V 6791 wf	<i>A. appressipila</i> x <i>A. pintoi</i>	CMEA 151

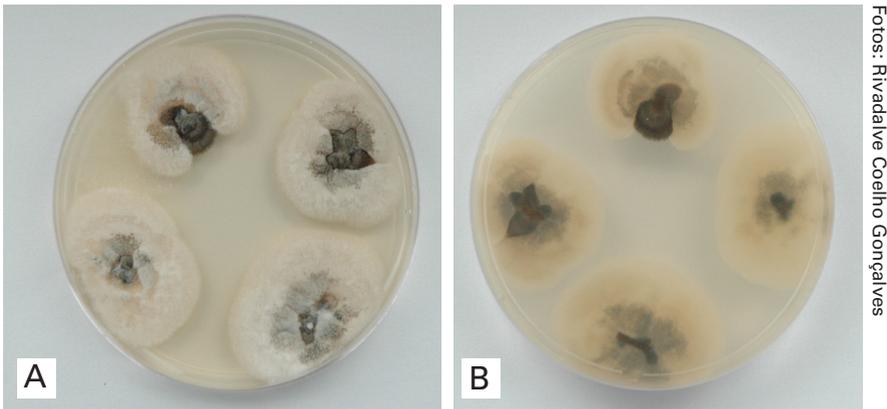


Figura 11. Aspecto macromorfológico das colônias de *G. cingulata* obtidas por isolamento indireto com meio BDA a partir de *Arachis pintoi*: visão superior (A) e verso das colônias (B).

5.3.3. Preservação durante o armazenamento

A preservação durante o armazenamento temporário por curto prazo pode ser feita em meio de cultura inclinado em tubos de ensaio contendo BDA (batata dextrose ágar). Para a preservação por tempo de aproximadamente 12 meses, o armazenamento pode ser feito em água destilada estéril (CASTELLANI, 1939), utilizando vidros com tampa de plástico ou de borracha dentro dos quais se coloca a água até a metade do volume e cinco discos de 5 mm de diâmetro de cultura do fungo em meio BDA ou OMA com 5 a 6 dias de idade (GONÇALVES et al., 2007).

5.4. Teste de patogenicidade de *Glomerella cingulata*

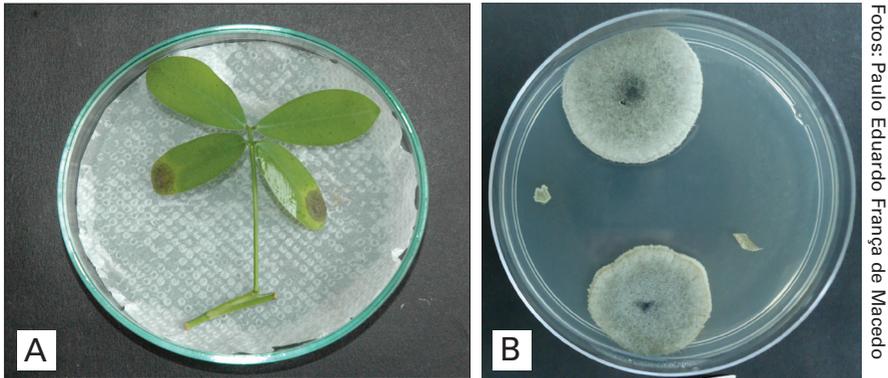
Como mencionado anteriormente, nem todo indivíduo isolado do hospedeiro tem a capacidade de causar doença em condições de inoculação artificial no tempo considerado apropriado para a pesquisa científica. Desse modo, ao ser obtido um fungo com as características de *Colletotrichum* e não havendo experiência clínica com a doença detectada

no local, o melhor é fazer o teste de patogenicidade para aumentar a certeza do diagnóstico.

Para tanto, os isolados obtidos devem ser cultivados em placas de Petri contendo meio BDA + 100 ppm de cloranfenicol a 25 °C, fotoperíodo de 12 horas. Preparar mudas saudáveis em substrato livre de patógenos e após 10 dias ressuspender os esporos em água destilada estéril. Utilizar alça de Drigalski para a raspagem dos conídios durante a operação. A suspensão obtida deve ser ajustada para $5,0 \times 10^5$ conídios.mL⁻¹ utilizando-se hemacitômetro ou câmara de Neubauer e um microscópio de luz comum, embora haja outros métodos.

Selecionar folhas completas e saudáveis e acondicioná-las em placa de Petri, uma por placa, forrada com papel toalha ou papel-filtro umedecido em água destilada estéril, para manutenção de câmara úmida. Em seguida, depositar sobre cada folíolo uma gota de 30 µL da suspensão de conídios e sobre as hastes pincelar a mesma suspensão. Como tratamento testemunha usar apenas água destilada estéril. Para cada isolado de fungo, utilizar três placas inoculadas.

Após 30 dias da inoculação as folhas e hastes devem ser avaliadas quanto à presença de sintomas (Figura 12A) e sinais, quando então se procede à nova operação de isolamento do fungo, utilizando quatro fragmentos de tecidos de cada tratamento, inclusive da testemunha. Os fragmentos devem ser lavados com detergente neutro, passados no álcool 70% por 1 minuto, em seguida em hipoclorito de sódio a 12.500 ppm por 3 minutos, lavados em água destilada estéril e colocados em placas com BDA + 100 ppm de cloranfenicol. As placas devem ser mantidas em BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas por 8 dias. Após esse período, realizam-se a avaliação do teste de reisolamento e a identificação dos fungos, que foram obtidos das folhas de *A. pintoii* inoculadas em laboratório (Figura 12B).



Fotos: Paulo Eduardo França de Macedo

Figura 12. Folíolos inferiores inoculados, apresentando sintomas da MFCF, e folíolos superiores não inoculados, sem sintomas da doença (A); colônias de *G. cingulata*, obtidas por isolamento indireto de folhas inoculadas em laboratório (B).

5.5. Mancha-de-mycosphaerella-do-amendoim-forrageiro

A doença mancha-de-mycosphaerella-do-amendoim-forrageiro é causada pelo fungo *M. berkeleyi*, frequentemente encontrado na fase anamórfica, atualmente denominado *P. personata*, com as seguintes sinonímias: *Phaeoisariopsis personata* (Berk. & M.A. Curtis) Arx., *Cercospora personata* (Berk. & M. A. Curtis) Ellis & Everh., *Cercosporidium personatum* (Berk. & M. A. Curtis) Deighton e *Cercosporiopsis personata* (Berk. & M. A. Curtis) Miura. O fungo ataca várias espécies de *Arachis* spp. e sobrevive em restos de cultura e na forma de conídios por mais de 10 meses no campo. Uma doença denominada mancha-preta (late leaf spot ou mycosphaerella leaf spot) (McDONALD et al., 1985), causada pela mesma espécie de fungo, ocorre em *A. hypogaea* no Brasil e em vários outros países, apresentando significativo efeito na produção de vagens dessa espécie quando não são adotadas medidas de controle (McDONALD et al., 1985; MORAES; GODOY, 1997).

5.5.1. Sintomas e sinais da mancha-de-mycosphaerella-do-amendoim-forrageiro

O patógeno causa lesões no limbo foliar e no pecíolo das folhas. Quando o fungo atinge a nervura principal, provoca a morte rápida da porção superior da folha infectada e a queda do folíolo (Figura 13A). As lesões foliares são escuras não circulares com halos amarelos expressivos na face superior dos folíolos, mas, lesões escuras sem halo expressivo também são encontradas (Figura 13B e 13C). A clorose que acompanha as lesões se expande tomando grande parte do limbo foliar (Figura 13D). A esporulação é anfígena, principalmente na face abaxial do folíolo. As lesões no pecíolo são escuras e elípticas alongadas.

Fotos: Rivaldive Coelho Gonçalves

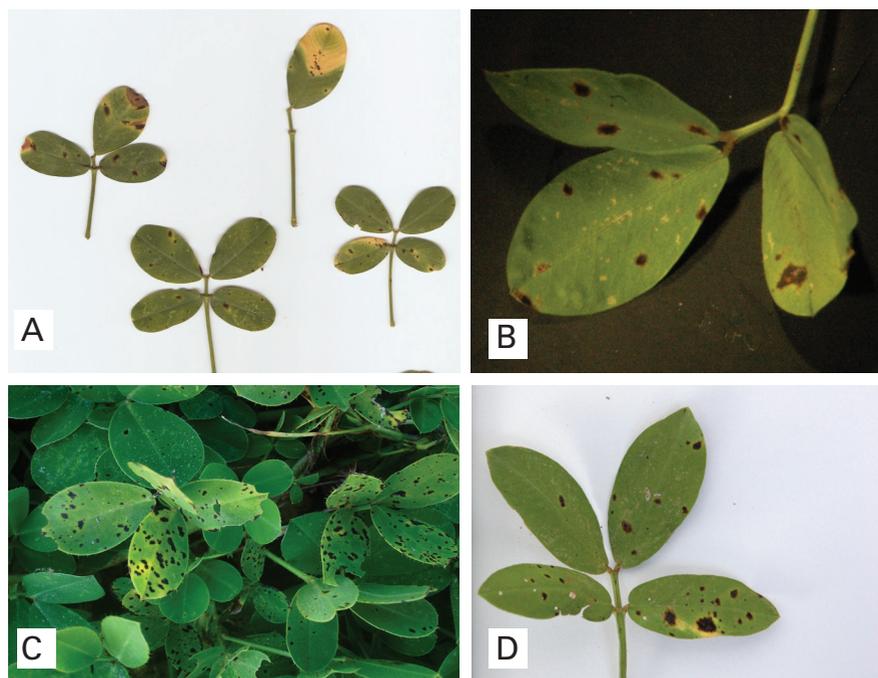
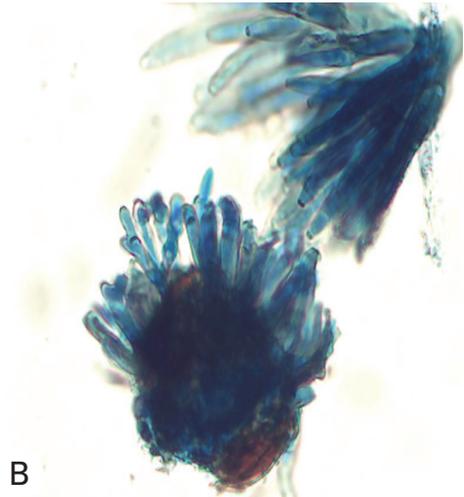
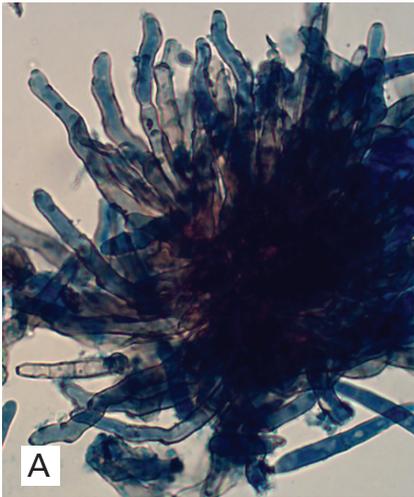


Figura 13. Folhas com sintomas da mancha-de-mycosphaerella-do-amendoim-forrageiro em *Arachis pinto* cv. BRS Mandobi: folíolos com lesões escuras, halo amarelo e desfolha (A); folíolos com lesões escuras com e sem halo amarelo (B, C e D).

5.5.2. Dados para identificação do anamorfo de *Mycosphaerella berkeleyi*

O fungo produz estromas pseudoparenquimatosos, nos quais podem ser encontrados os sinêmios com conidióforos curtos geniculados (Figura 14A) ou não geniculados (Figura 14B), onde nascem os conídios (Figura 15A). Os conidióforos são marrom-claros e os conídios são hialinos, clavados, retos ou curvos, arredondados no ápice afilado com cicatriz pronunciada na base (Figura 15B, 15C, 15D, 15E). A estrutura estromática é, portanto, um sinêmio curto, com os conidióforos unidos na base, formando um fascículo denso, diferentemente de *Pseudocercospora griseola* (Saccardo) Crous & U. Braun, agente da mancha-angular-do-feijoeiro que tem um sinêmio longo, fasciculado e denso.



Fotos: Paulo Eduardo França de Macedo

Figura 14. Sinêmio com conidióforos curtos geniculados (A) e conidióforos não geniculados (B) do anamorfo de *M. berkeleyi* a partir de *Arachis pintoi* cv. BRS Mandobi.

Fotos: Paulo Eduardo França de Macedo (A) e Rivaldive Coelho Gonçalves (B, C, D, E)



Figura 15. Sinêmio do anamorfo de *M. berkeleyi* a partir de *Arachis pintoi* cv. BRS Mandobi mostrando conidiogênese (A) e conídios com cicatrizes pronunciadas na base (B, C, D e E).

Para a identificação da espécie é importante também a definição do hospedeiro em que é encontrado o fungo causando a doença com lesão esporulante. A resposta positiva é registrada com o numeral 1 para as plantas hospedeiras *A. hypogaea*, *A. pintoi*, *A. glabrata*, *A. helodes*, *A. appressipila* x *A. pintoi*, *A. pintoi* x *A. pintoi* e *A. repens*, todas no gênero *Arachis*, e com o numeral 0 para outros hospedeiros no mesmo gênero. As demais características com resultado positivo notado no numeral 1 são: lesão na lâmina foliar circular a irregular se coalescida 1 mm–10 mm de diâmetro; lesão elipsoidal no pecíolo; lesão na lâmina foliar marrom-escura a negra; frutificação anfígena ou principalmente adaxial; frutificação globular; frutificação marrom a negra 20–30 μm de diâmetro; conidióforos agrupados em fascículos; estroma com 70–200 μm de diâmetro; fascículo denso a muito denso, com mais de 5 conidióforos; conidióforo pigmentado marrom-dourado; conidióforo marrom-claro a oliváceo marrom-escuro uniforme; conidióforo reto a levemente curvo arredondado ou truncado no ápice; conidióforos com 1–3 septos,

levemente a abruptamente geniculados; conidióforo sem ramificação com cicatriz abrupta; conidióforo 3,0–5,0 μm x 10–70 μm ; conídio reto a levemente curvo; conídio cilíndrico, elipsoidal, levemente clavado ou fusiforme, geralmente não curvado; conídio de forma cilíndrica a levemente fusiforme ou obclavado, reto a levemente curvo; conídio de base abruptamente arredondada ou longa obconicamente truncada; conídio com septo apenas transversal; conídio 5,0–7,5 μm x 20–70 μm ; cor do conídio sub-hialino a oliváceo-claro; número de septos do conídio 3 a 8; número predominante de septos do conídio 2 e 5. Para essas características a presença é notada com 1 e a ausência com 0. Para as características a seguir, a presença é notada com 0 e a ausência com 1: lesão na lâmina foliar circular a irregular se coalescida 1 mm–5 mm de diâmetro; lesão na lâmina foliar marrom-escura a negra com halo amarelo; lesão na lâmina foliar marrom-clara; frutificação predominantemente abaxial ou adaxial; conidióforos livres; fascículo pouco denso com menos de 5 conidióforos; conidióforo não pigmentado; conidióforos com 0–2 septos, levemente a abruptamente geniculados duas vezes; conidióforo 3,0–5,0 μm x 20–45 μm ; conídio reto; conídio de ápice, agudo, obtuso, truncado ou obconicamente truncado; forma de septo transversal e longitudinal; conídio 3–4 μm x 40–100 μm ; cor do conídio hialino; número de septos do conídio 3 a 12; número predominante de septos do conídio 3 e 7.

Com essas 49 respostas, é possível montar a planilha para a análise de agrupamento, ou mesmo deduzir a identificação do fungo, utilizando os dados disponíveis na literatura para o anamorfo de *M. berkeleyi*. Para tanto, o isolado que se deseja identificar deve agrupar com distância zero do táxon descrito ou apresentar uma similaridade superior àquela que demarca a separação de *M. arachidicola*, W. A. Jenkins até o momento. O aumento da robustez da análise, no entanto, deverá ser conseguido com a coleta de dados de um número relativamente grande de isolados do fungo.

5.5.3. Isolamento de *Mycosphaerella berkeleyi*

O isolamento de *M. berkeleyi* a partir de folhas de *A. pintoi* em meio de cultura é difícil e tem resultado em insucesso, utilizando protocolo padrão para isolamento indireto de fungos de folhas ou também por meio do isolamento direto a partir de esporos da fase assexuada, a 25 °C utilizando meio BDA e meio V8, com cloranfenicol a 100 ppm com avaliação final aos 45 dias.

As plantas nas quais se espera encontrar essa doença e o fungo em Rio Branco, AC, e outras regiões do Brasil onde há o hospedeiro são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Gama de hospedeiros de *Mycosphaerella berkeleyi* em condições de infecção natural com sintoma de mancha-foliar em Rio Branco, AC.

Número do acesso no BAG da Embrapa Acre	Código do acesso no BAG da Embrapa Acre	Nome científico	Sintoma	Sinal
10	V 13468 x V 13167	<i>A. pintoi</i> x <i>A. pintoi</i>	+	+
12	V 13468 x G 12787	<i>A. pintoi</i> x <i>A. pintoi</i>	+	+
25	W 215	<i>A. repens</i>	+	+
26	W 788	<i>A. repens</i>	+	+
35	W 1005 = W 200	<i>A. repens</i>	+	+
50	NC	<i>A. pintoi</i>	+	+
53	V 6740	<i>A. pintoi</i>	+	+
61	Belmonte	<i>A. pintoi</i>	+	+
73	VMc 96 x 7	<i>A. pintoi</i> x <i>A. repens</i>	+	+
77	BRS Mandobi	<i>A. pintoi</i>	+	+
92	V 6674	<i>A. repens</i>	+	+
109	V 13282	<i>A. pintoi</i>	+	+
113	Pingo de Ouro = V 15230	<i>A. helodes</i>	+	-
116	Epagri Ituporanga	<i>A. pintoi</i>	+	+
129	GKP 10002 x V 6791 wf	<i>A. appressipila</i> x <i>A. pintoi</i>	+	+
133	JK 3	<i>A. pintoi</i>	+	+

NC: não consta; +: presença; -: ausência.

5.6. Podridão-da-haste e queima-foliar-de-athelia-do-amendoim-forrageiro

A podridão-da-haste e a queima-foliar-de-athelia-do-amendoim-forrageiro são duas doenças causadas pelo mesmo fungo denominado *A. rolfsii* (anamorfo: *Sclerotium rolfsii* Saccardo) primeiramente relatadas em 2006 em *A. pintoi* AP 65 no Município de Rio Branco, AC (GONÇALVES et al., 2006). Também são reconhecidas as seguintes sinônimas para esse fungo: *Corticium rolfsii* Curzi, *Pellicularia rolfsii* (Curzi) E. West, *Botryobasidium rolfsii* (Curzi) Venkatar. Essa espécie também está relatada na sua fase anamórfica como agente causal da doença podridão-do-colo em *A. pintoi* no Brasil (ANJOS, CHARCHAR, AKIMOTO, 2001; CHARCHAR et al., 2004) e também como agente causal de queima em *A. glabrata* cv. Arbrook nos EUA, lembrando uma doença denominada podridão-da-haste-do-sul (=southern stem rot) que ocorre em *A. hypogaea* (STANLEY; SHOKES; BERGER, 1996). Nos países de língua inglesa, a principal doença causada por *A. rolfsii* é conhecida como “southern blight” e “southern stem blight”; entretanto, no Brasil, é denominada por murcha-de-sclerotium (MORAES; GODOY, 1997). O fungo ataca mais de 500 espécies de plantas e aproximadamente 100 famílias diferentes (SHEW; BEUTE; CAMPBELL, 1984). Sua arma principal é a produção de grande quantidade de ácido oxálico que causa a necrose inicial nos tecidos sadios dos hospedeiros anulando as defesas para em seguida ocorrer a extensa colonização e a morte da planta. Devido à grande quantidade de rizomas (caule rente ao solo) que *A. pintoi* produz, são esperados danos significativos na produção de sementes e biomassa apenas quando o inóculo do fungo estiver bem-distribuído na área e em quantidade suficiente para uma epidemia de podridão-do-colo, o que mataria as plantas na fase de estabelecimento, em condições ambientais favoráveis. No entanto, a morte de plantas pelas doenças queima-foliar-de-athelia e podridão-da-haste após

a cobertura total do solo também pode ser prejudicial à produção de sementes com boa qualidade sanitária.

5.6.1. Sintomas e sinais da podridão-da-haste e queima-foliar-de-athelia

Os sintomas encontrados nas plantas no campo são necrose da haste madura e de brotações, queima de folhas, murcha e morte de hastes de plantas. Em *A. pintoii* cv. BRS Mandobi plantas mortas formam reboleiras de cerca de 0,3 m de diâmetro, conforme observado em maio de 2011 (Figura 16A) e em fevereiro de 2014 (Figura 16B) em área plantada para a produção de sementes, em Rio Branco, AC.

Devido a essa sintomatologia, considerou-se mais apropriado caracterizar o problema pela podridão-da-haste (=stem rot) e também pela doença queima (blight) que pode ou não ocorrer simultaneamente com a primeira. A murcha e a morte de porção da planta ou da planta inteira são, portanto, sintomas finais das doenças. Outro aspecto importante de ser observado é que 6 meses após a poda do amendoim forrageiro a doença pode ser encontrada sob o dossel foliar causando a queima e a podridão da haste sem que o fato seja facilmente perceptível tal como em uma reboleira de plantas mortas.

O fato dessas reboleiras ocorrerem no padrão espacial ao acaso até o momento em Rio Branco pode ser indicativo de que elas não se iniciam nas folhas com esporos sexuais, os quais teriam uma dispersão mais ampla nas áreas cultivadas e elevariam muito o número de focos.

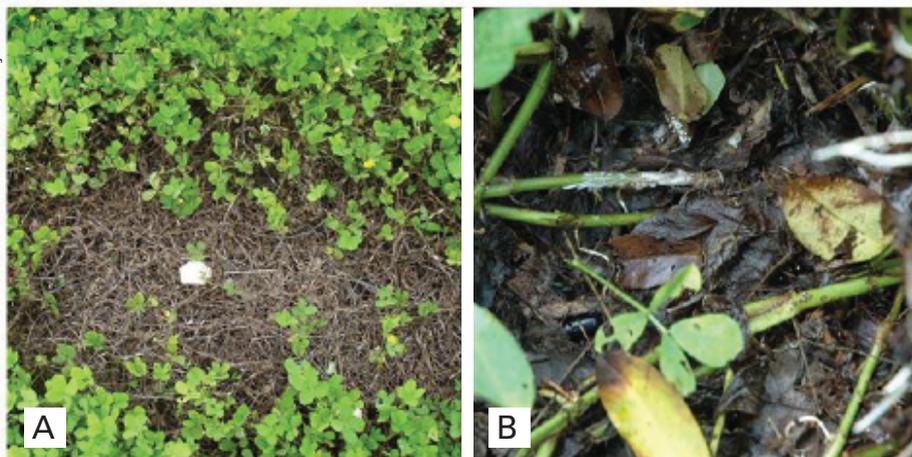


Figura 16. Planta de *A. pintoii* morta pelas doenças podridão-da-haste e queima-foliar-de-athelia (A) e rizomorfos brancos do anamorfo do patógeno (B).

5.6.2. Dados para identificação do anamorfo de *Athelia rolfsii*

A identificação do patógeno pode ser feita pela análise micro e macromorfológica do fungo, o qual apresenta micélio branco cotonoso, hifas finas aéreas e escleródios marrom-avermelhados, quando maduros, irregularmente globosos (Figura 17A), com \emptyset transversal médio de 1,103 mm, variando de 0,890 mm a 1,298 mm, e altura média de 1,4 mm, variando de 1,196 mm a 1,680 mm. Os escleródios apresentam uma camada externa constituída de células de paredes grossas (Figura 17B). Ao microscópio de luz comum é possível constatar as hifas septadas com grampo de conexão além da estrutura peculiar do escleródio do fungo.

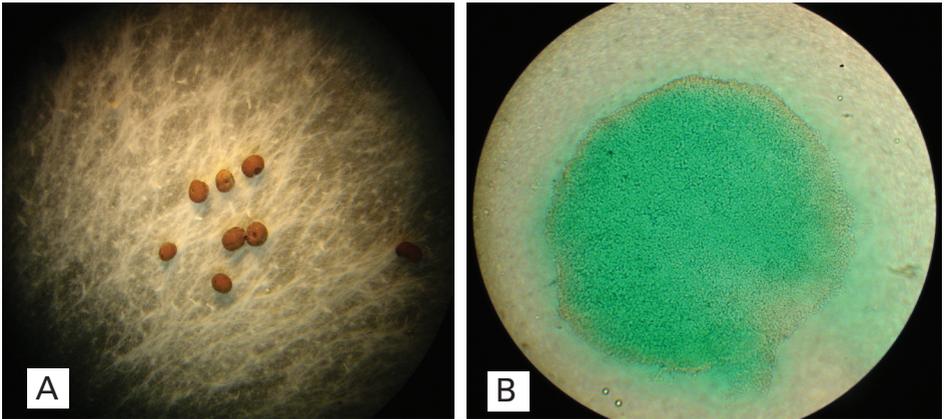


Figura 17. Micélio branco cotonoso e escleródios marrom-avermelhados do fungo *A. rolfsii* em sua fase de anamorfo (A) e corte transversal de escleródio visto ao microscópio de luz comum (B).

5.6.3. Isolamento de *Athelia rolfsii*

O fungo pode ser isolado a partir dos fragmentos de hastes (Figura 18A) infectadas, folhas infectadas ou por plantio direto de escleródios (Figura 18B) em meio de cultura BDA (batata dextrose ágar) com antibiótico cloranfenicol a 50 ppm. O procedimento para isolamento indireto requer a separação das hastes ou folhas atacadas, as quais devem ser lavadas com água e detergente neutro. Pequenos fragmentos de tecido da borda da lesão devem ser desinfestados em etanol 70% por 1 minuto e NaOCl 12.500 ppm por 3 minutos. Após serem lavados em água destilada estéril, os fragmentos devem ser plantados no meio de cultura. Em seguida, as placas de Petri devem ser colocadas em incubadora a 25 °C sem fotoperíodo. Após 5 dias, observar as colônias brancas cotonosas típicas do fungo e repicá-lo a partir da borda, para tubos de ensaio. Em Rio Branco, os hospedeiros desse fungo estão relatados na Tabela 6.

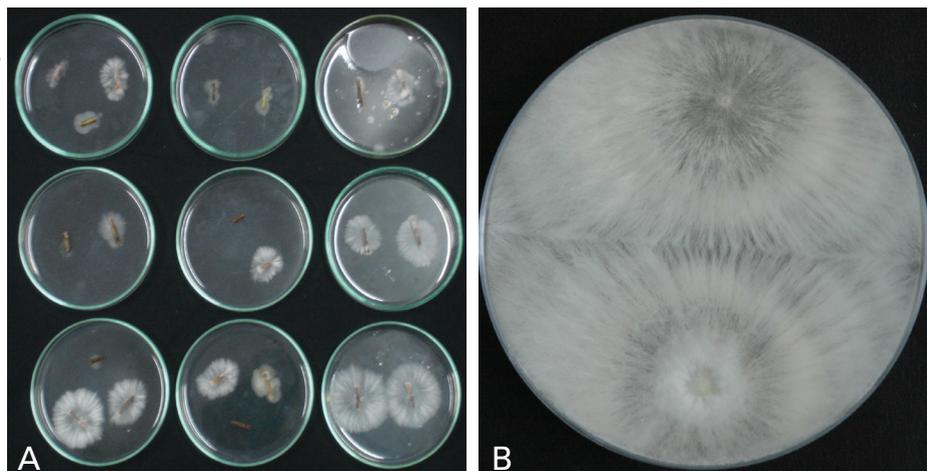


Figura 18. Colônias do anamorfo do fungo *A. rolfsii* a partir de tecidos infectados da haste do amendoim forrageiro (A) e verso de colônias do fungo crescidas a partir de escleródios (B).

Tabela 6. Gama de hospedeiros de *Athelia rolfsii* em condições de infecção natural com sintoma de queima e podridão-da-haste, em Rio Branco, AC.

Número do acesso no BAG da Embrapa Acre	Código do acesso no BAG da Embrapa Acre	Nome científico	Código do fungo
77	BRS Mandobi	<i>A. pintoii</i>	NC
61	BRS Belmonte	<i>A. pintoii</i>	NC

NC: não codificado.

5.6.4. Armazenamento de *Athelia rolfsii*

O armazenamento temporário pode ser feito em tubo de ensaio com o meio BDA inclinado ou em água destilada estéril no formato de discos de colônias por cerca de 12 meses, sendo esperado que alguns isolados sobrevivam a até aproximadamente 18 meses em água. O fungo sobrevive ao congelamento até $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pode ser armazenado de forma viável por 28 meses em refrigerador de nitrogênio líquido ($-165\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) (HWANG, 1996). Outros métodos eficientes e de baixo custo também podem ser testados utilizando-se

escleródios formados em tecidos vegetais do hospedeiro que são as estruturas naturais de resistência a déficit hídrico desse fungo. O importante é que ao final de um ciclo de armazenamento, a maioria dos indivíduos esteja viável e sem mutações prejudiciais perceptíveis.

5.6.5. Teste de patogenicidade de *Athelia rolfsii*

O teste de patogenicidade é importante para confirmar a etiologia da doença. Nos casos de não haver no local câmara de nevoeiro em sala climatizada para o teste de patogenicidade, pode-se realizá-lo em uma sala climatizada com aparelho de ar-condicionado ou dentro de uma incubadora tipo BOD a 25 °C, utilizando-se folhas destacadas do hospedeiro. Para tanto, o fungo deve ser cultivado em meio BDA por 72h. Da borda da colônia, devem-se cortar discos de 5 mm com tubo metálico flambado e com estilete, no formato “L” retirar os discos e depositar sobre os folíolos limpos colocados dentro de placas de Petri autoclavadas com papel-filtro a 120 °C por 15 minutos. Ao final do teste, os folíolos que não foram inoculados com o fungo permanecem verdes (Figura 19A) e aqueles do tratamento inoculado apresentam-se totalmente necrosados (Figura 19B). Outro método de avaliar a patogenicidade é o uso de mudas e câmara úmida formada por sacos plásticos (Figura 20A), sempre que possível, em sala climatizada. Os testes em casa de vegetação sem controle de temperatura podem falhar devido a oscilações desse fator físico com grande amplitude, mas em alguns casos pode dar certo (Figura 20B e 20C).

Fotos: Paulo Eduardo França de Macedo

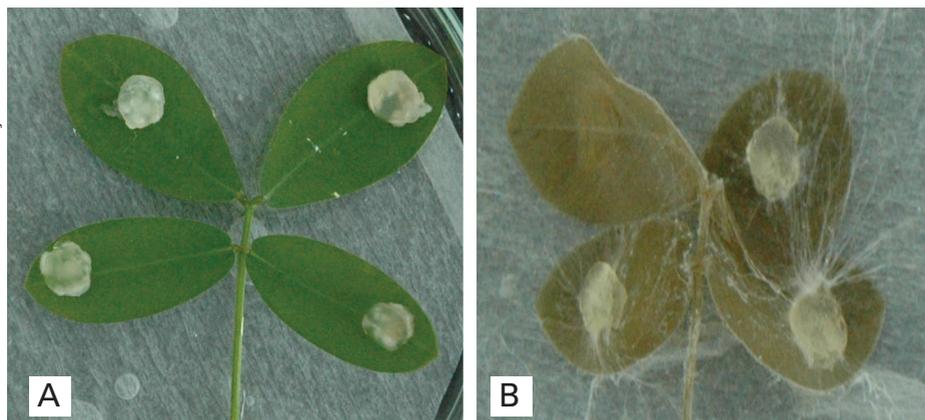


Figura 19. Folhas de *A. pintoi* em teste de patogenicidade: folha não inoculada, sadia (A) e folha inoculada, doente (B), 6 dias após a inoculação.

Fotos: Rivaldvalve Coelho Gonçalves



Figura 20. Plantas de *A. pintoi* em câmara úmida (A), planta não inoculada com aspecto saudável (B) e planta murcha pela doença podridão-da-haste (C).

5.7. Queima-foliar-de-rhizoctonia-do-amendoim-forrageiro

A queima-foliar-de-rhizoctonia-do-amendoim-forrageiro é uma doença causada pela espécie *T. cucumeris*, frequentemente encontrada na fase de anamorfo denominada *R. solani*. Esse fungo ataca centenas de hospedeiros utilizados pela humanidade. Com o avanço

do conhecimento científico sobre a biologia do fungo descobriu-se que dentro da espécie há grupos distintos caracterizados pela reação positiva de anastomose de hifas entre indivíduos do mesmo grupo (OGOSHI, 1975) e, pela gama de hospedeiros, muitas vezes relacionada ao grupo intraespecífico, ao qual pertence o indivíduo. O fungo encontrado no Acre, atacando *A. repens*, codificado como CMEA 152, foi identificado como *R. solani* AG1-1K. O isolado encontrado em *A. pintoii* cv. BRS Mandobi não foi identificado ao nível de grupo de anastomose até o momento (Tabela 7).

Tabela 7. Gama de hospedeiros de *Thanatephorus cucumeris* em condições de infecção natural em *Arachis* spp. com sintoma de queima, em Rio Branco, AC.

Número do acesso no BAG da Embrapa Acre	Código do acesso no BAG da Embrapa Acre	Nome científico	Código do fungo
61	BRS Belmonte	<i>A. pintoii</i>	NC
77	BRS Mandobi	<i>A. pintoii</i>	NC
91	V 14475	<i>A. repens</i>	CMEA 152

NC: não codificado.

5.7.1. Sintomas e sinais da queima-foliar-de-rhizoctonia-do-amendoim-forrageiro

A queima-foliar-de-rhizoctonia-do-amendoim-forrageiro causa a necrose das folhas após o crescimento epifítico do micélio a partir do solo, sobre o limbo foliar. As folhas ficam com o aspecto de queima química devido ao processo final de desidratação e morte das células em lesão cor cinza no início. Em seguida, as folhas desprendem-se da haste e caem ou permanecem presas às hastes pelo micélio do fungo. Em épocas chuvosas as reboleiras, características do ataque do fungo às plantas, podem ser visualizadas a média distância do local (Figura 21A). Na análise das plantas,

é possível ver, a olho nu, o micélio aderido à superfície dos tecidos atacados (Figura 21B). Escleródios marrons e himênio branco de *T. cucumeris*, principalmente nas hastes, também podem ser observados no campo em condições de muita umidade.

Fotos: Rivadave Coelho Gonçalves

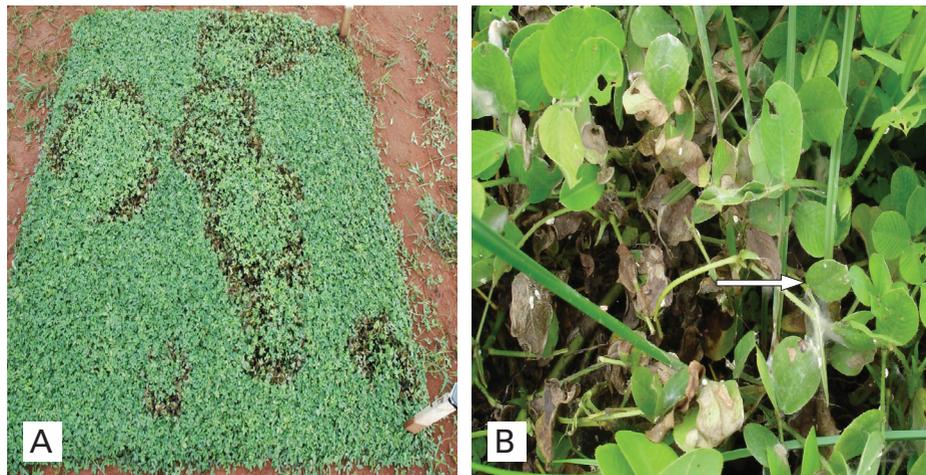
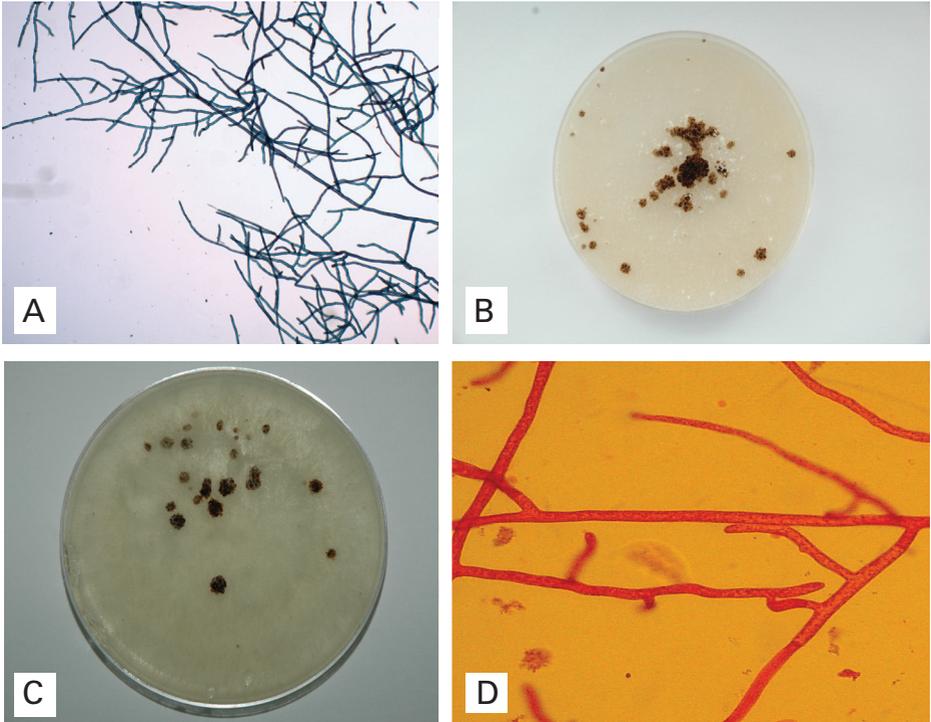


Figura 21. Plantas de *A. repens* (A) e *A. pintoi* cv. BRS Mandobi (B) em Rio Branco, AC, apresentando sintomas da queima-foliar-de-rhizoctonia, com destaque para a teia micélica do patógeno (B).

5.7.2. Identificação de *Thanatephorus cucumeris*

A identificação de *T. cucumeris* pode ser feita pelo seu anamorfo *R. solani* por análise de macro e micromorfologia do fungo em cultura pura. As características marcantes da espécie são micélio septado com ramificação a 90° tendo uma constricção na base (Figura 22A), septos distais dolíporos e vários núcleos em cada célula da hifa (PARMETER JUNIOR; WHITNEY, 1970). O diâmetro da hifa também é bem-diferenciado em relação a muitos outros fungos. Os isolados encontrados até o momento em *Arachis* spp. produzem escleródios marrons em meio de cultura BDA a 25 °C (Figura 22B e 22C).

A reação positiva de anastomose (Figura 22D) com o isolado de referência do grupo AG1, subgrupo 1K, confirma a identificação da espécie em um dos nove grupos de anastomose relatados até o momento.



Fotos: Rivadulve Coelho Gonçalves (A, B, C) e Bernardo de Almeida Halfeld Veira (D)

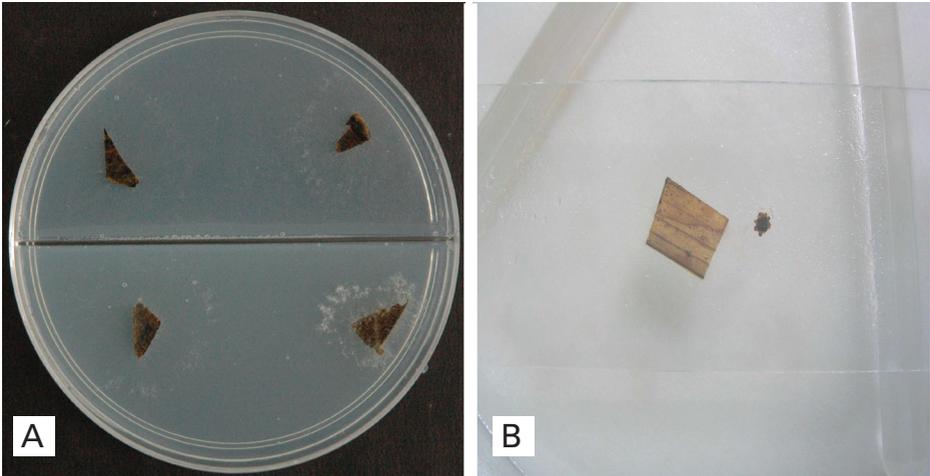
Figura 22. Hifas de *T. cucumeris* corado com azul de algodão (A), colônia com escleródios (B e C) e hifas do patógeno de *Arachis* spp., em teste de anastomose (D).

5.7.3. Isolamento de *Thanatephorus cucumeris*

Para isolar o fungo, selecionar na amostra o tecido mais recentemente atacado, quando a amostra tiver partes verdes. Lavar e desinfestar bem a amostra utilizando solução aquosa de detergente neutro a 1%. Passar a amostra para dentro da câmara de fluxo laminar vertical e seccioná-la em pedaços de aproximadamente 5 mm x 5 mm na interface do tecido com e sem lesão. Imergir os fragmentos em etanol 70% por 1 minuto, retirá-los e imergi-los em NaOCl 12.500 ppm por 1 minuto. Em seguida, lavar três vezes com água destilada estéril. Secar os fragmentos em papel-filtro esterilizado e plantá-los no meio de cultura ágar-água 2%, m/v, acidificado com ácido láctico para pH = 4,0 vertido e solidificado em placas de Petri. Fechar as placas com filme plástico e colocá-las em incubadora a 25 °C. Após 48h observar as placas a olho nu contra a luz natural ou em microscópio estereoscópico para identificar a colônia do fungo, que é muito rala no início (Figura 23A). Marcar com pincel no fundo da placa uma região da hifa a ser cortada para a purificação do fungo. Em câmara de fluxo, flambar o estilete, esfriá-lo no meio de cultura, cortar a região demarcada e transferir para um tubo de ensaio resistente de 18 mm de diâmetro x 18 cm de comprimento contendo meio de cultura BDA inclinado. Etiquetar o tubo e armazená-lo novamente em incubadora a 25 °C para o crescimento do fungo. Eliminar tubos contaminados e preservar aqueles de cultura pura do patógeno.

O isolamento direto do patógeno também pode ser realizado no mesmo meio de cultura. Com uma pinça, retirar o escleródio ou uma porção de hifas, preso ao tecido vegetal ou mesmo recuperado do solo, de lotes de sementes ou de lesões velhas (Figura 23B) e semear o inóculo no meio de cultura. Colocar as placas em incubadora a 25 °C e repicar

a ponta da hifa, quando esta estiver suficientemente grande e livre de bactérias ou outros contaminantes que possam aparecer.



Fotos: Rivadave Coelho Gonçalves

Figura 23. Colônias ralas de *T. cucumeris* em atividade de isolamento indireto do patógeno a partir de folhas doentes de *A. pintoi* (A) e lâmina com escleródio formado a partir de lesão foliar do patógeno em *Cynodon nlenfluensis* Vanderyst (B).

5.7.4. Armazenamento de *Thanatephorus cucumeris*

O armazenamento temporário de *T. cucumeris* pode ser feito no próprio tubo de ensaio com o meio BDA inclinado. Outro método de baixo custo e eficiente é aquele em água destilada estéril (BOESEWINKEL, 1976). Diferentes métodos de armazenamento de fungos desse gênero por longo prazo também foram desenvolvidos, dentre os quais, pode-se citar o armazenamento em grãos de cereais (arroz, aveia, cevada e trigo) colonizados e congelados (NAITO et al., 1993; GONÇALVES; ALFENAS; MAFIA, 2007; WEBB et al., 2011) ou em suspensão de células em glicerol a 10% v/v congelada em nitrogênio líquido (HWANG, 1996).

5.7.5. Teste de patogenicidade de *Thanatephorus cucumeris*

O teste de patogenicidade do fungo obtido também deve ser executado para comprovar se o indivíduo que foi amostrado é virulento. A técnica de folha destacada pode ser utilizada tal como descrita no item anterior, ou ainda, caso haja a possibilidade de ter plantas completas e a estrutura de câmara de nevoeiro em sala climatizada, para o estudo da interação planta-patógeno, as chances de sucesso no teste de patogenicidade são maiores.

O fungo deve ser cultivado em BDA por 4 dias, e discos de micélio de 5,0 mm de diâmetro cortados com furador de cortiça ou outro cortador metálico, flambado, são utilizados como inóculo. Na Figura 24A consta um exemplo de folha sadia do tratamento não inoculado e na Figura 24B um exemplo de folha doente do tratamento inoculado em teste de patogenicidade de *T. cucumeris* a *A. pintoii*.

Fotos: Paulo Eduardo França de Macedo

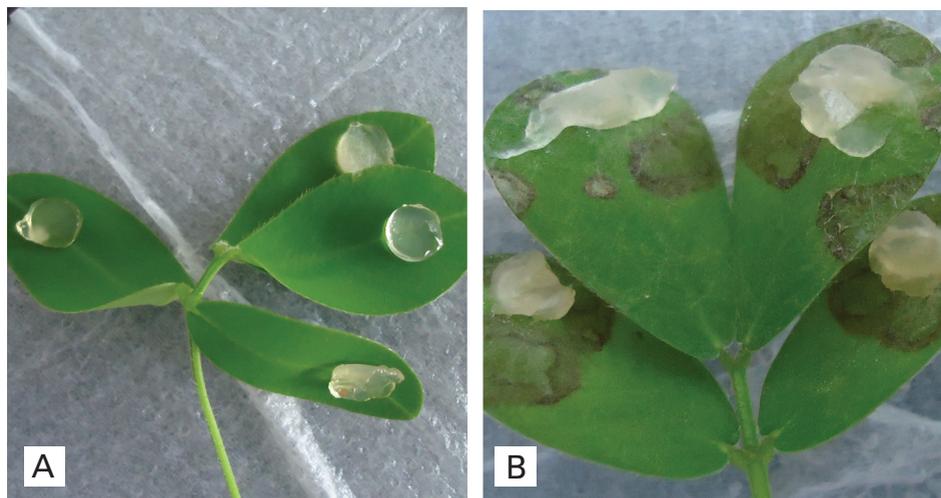


Figura 24. Folhas de *A. pintoii* em teste de patogenicidade de *T. cucumeris*: folha não inoculada, sadia (A) e folha inoculada, doente (B).

6. Referências

AGRIOS, G. N. Introduction. **Plant Pathology**. New York, v. 18, n. 1, p. 1-14, mar. 1969.

ANJOS, J. R. N. dos; KITAJIMA, E. W.; CHARCHAR, M. J. D'A.; MARINHO, V. L. A. Infecção natural de *Arachis pintoï* por "Peanut mottle virus" no Brasil Central. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 23, n. 1, p. 71-74, 1998.

ANJOS, J. R. N.; CHARCHAR, M. J. A.; AKIMOTO, A. K. *Arachis pintoï* Nova Hospedeira de *Sclerotium rolfsii*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 34. , 2001, São Pedro, SP. **Resumos...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2001. v. 26. p. 359.

ARGEL, P. J. Regional experience with forage *Arachis* in Central America and Mexico. In: KERRIDGE, P. C. ; HARDY, B. (Eds.). **Biology and agronomy of forage *Arachis***. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1994. p. 134-143.

ARGEL, P. J.; PIZARRO, E. A. Germplasm case study: *Arachis pintoï*. In: **PASTURES for the Tropical Lowlands: CIAT's Contributions**. Cali: CIAT, 1992. p. 57-73.

BOESEWINKEL, H. J. Storage of fungus cultures in water. **Transactions British Mycological Society**, Ardwick, Manchester, v. 66: n. 1, p. 183-185, feb. 1976.

CARNEIRO, R. M.; CARNEIRO, R. G.; NEVES; D. I. das; ALMEIDA; M. A. Nova raça de *Meloidogyne javanica* detectada em *Arachis pintoï* no Estado do Paraná. **Nematologia Brasileira**, Campos dos Goytacases, v. 27, n. 2, p. 219-221, 2003.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, San Francisco, v. 42, p. 225-226, 1939.

CHARCHAR, M. J. d'A.; ANJOS, J. R. N. dos; ANDRADE, R. P. de; FERNANDES, F. D.; FERNANDES, C. D. **Doenças de *Arachis forrageiro* no Distrito Federal**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2004. 18 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, n. 133).

CHARCHAR, M. J. d'A.; PIZARRO, E. A. Doenças fúngicas em *Arachis forrageiro* no Cerrado, Brasil. **Pasturas Tropicales**, Cali, v. 17, n. 2, p. 42-43, ago. 1995.

EMBRAPA Informática Agropecuária. **Diagnose virtual**. 2010. Disponível em: <<http://www.diagnose.cnptia.embrapa.br/diagnose/>>. Acesso em: 24 jan. 2014.

FU, B. Z.; YANG, M.; LI, G. Y.; WU, J. R.; ZHANG, J. Z.; HAN, C. Z. First report of leaf spot disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on chinese bean tree in China. **Plant Disease**, St. Paul, v. 97, n. 1, p. 138, jan. 2013. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-03-12-0261-PDN>>. Acesso em: 01 jul. 2014.

GONÇALVES, R. C.; VALENTIM, J. F.; BALZON, T. A. Podridão da haste e queima do amendoim forrageiro *Arachis pintoi* Krap & Greg no Estado do Acre, Brasil, causadas pelo anamorfo de *Athelia rolfsii* (Curzi) Tu & Kinbrough: primeiro relato. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 31. p. 292-293, 2006.

GONÇALVES, R. C. Doenças em *Arachis pintoii* cv. BRS Mandobi. In: VALENTIM, J. F. **Produção de sementes de *Arachis pintoii* cv. BRS Mandobi no Acre**. Rio Branco, AC. Embrapa Acre, 2011. (Embrapa Acre, Sistemas de Produção, 4). Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Amendoim/ProducaoSementesArachisAcre/referencias.htm>>. Acesso em: 24 jan. 2014.

GONÇALVES, R. C.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Ed.). **Métodos de Fitopatologia**. Viçosa, MG: UFV, 2007. 382 p. p. 91-102.

GONÇALVES, R. C.; OLIVEIRA, R. D. D. L.; VALLIM, J. H.; MACEDO, P. E.; ARAÚJO, E. O. Espécies de *Meloidogyne* que atacam *Arachis* spp. no Acre, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 46., 2013, Ouro Preto. **Resumos...** Ouro Preto: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2013. Resumo 15. 1 CD-ROM.

HENNEN, J. F.; FIGUEIREDO, M. B.; RIBEIRO, I. J. A.; SOAVE, J. The occurrence of teliospores of *Puccinia arachidis* (Uredinales) on *Arachis hypogaea* in São Paulo State, Brazil. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 44-46, 1976.

HENNEN, J. F.; HENNEN, M. M.; FIGUEIREDO, M. B. Índice de ferrugens (Uredinales) do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 49, n. 1, p. 1-201. 1982. Suplemento 1.

HENNING, A. A.; ALMEIDA, A. M. R.; GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; YORINORI, J. T.; COSTAMILAN, L. M.; FERREIRA, L. P.; MEYER, M. C.; SOARES, R. M.; DIAS, W. P. **Manual de identificação de doenças de soja**. Londrina, PR: Embrapa Soja, 2005. 74 p. (Embrapa Soja. Documentos, n. 256).

HOWARD, C. M.; ALBREGTS, E. E. Black leaf spot phase of strawberry anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (= *C. fragariae*). **Plant Disease**, St. Paul, v. 67, p. 1144-1146, 1983.

HWANG, S. W. Long-term preservation of fungus cultures with liquid nitrogen refrigeration. **Applied Microbiology**, Washington, DC, v. 14, n. 5, p. 784-788, 1996.

INZÉ, D.; MONTAGU, M. V. Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, Iowa, v. 6, n. 2, p. 153-158, 1995.

JANINI, J. C.; BOIÇA JÚNIOR, A. L.; DE GODOY, I. J.; MICHELOTTO, M. D.; FÁVERO, A. P. Avaliação de espécies silvestres e cultivares de amendoim para resistência a *Enneothrips flavens* Moulton. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 4, p. 891-898, dec. 2010.

JENKINS, A. E. Applications of the terms anthracnose and scab to plant diseases caused by *Sphaceloma* e *Gloeosporium*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 23, p. 389-395, 1933.

KELEMU, S.; BADEL, J. L.; MORENO, C. X. Virulence spectrum of South American isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* on selected *Stylosanthes guianensis* genotypes. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, p. 1355-1358, 1996.

KELEMU, S.; MUNOZ, F.; RODRIGUEZ, M. X. Diversidad genética y patogénica de los aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* que infectan la leguminosa forrajera *Arachis pintoii*. **Pasturas Tropicales**, Colombia, v. 23, n. 3, 16-21. 2000.

KENNELLY, M.; O'MARA, J.; RIVARD, C.; MILLER, G. L.; SMITH, D. Introduction to abiotic disorders in plants. **The Plant Health Instructor**. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/Abiotic.aspx> 2012>. Acesso em: 23 jan. 2014. DOI: 10.1094/PHI-I-2012-10-29-01.

KERRIDGE, P. C.; HARDY, B. (Eds.). **Biology and Agronomy of Forage Arachis**. Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1994. (CIAT Publication, n. 240).

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. Campinas: Ceres, 2005. v. 2. 663 p.

KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, Argentina, v. 8, n. 1/4, p. 1-186, 1994.

MCDONALD, D; SUBRAHMANYAM, P; GIBBONS, R. W.; SMITH, D. H. **Early and late leaf spots of groundnut**. Índia: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 1985. 28 p.(ICRISAT Information Bulletin, n. 21).

MORAES, S. A. de; GODOY, I. J. de. Amendoim. *Arachis hypogaea* L. Controle de doenças. In: VALE, F. X. R. do; ZAMBOLIM, L. **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa: UFV, 1997. p. 1-49.

NAITO, S.; YAMAGUCHI, T.; SUGIMOTO, T.; HOMMA, Y. A Simple method for the long-time culture storage of *Rhizoctonia* spp. on barleys' grains. **Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan**, v. 1993, n. 44, p. 20-23, 1993. DOI: <http://dx.doi.org/10.11455/kit/kitanihon1966.1993.20>.

OGOSHI, A. Grouping of *Rhizoctonia solani* Kühn and their perfect stages. **Review of Plant Protection Research**, Poland, v. 8, p. 93-103, 1975.

PARMETER JUNIOR, R., WHITNEY, H. S. Taxonomy and nomenclature of the imperfect state. In: PARMETER JUNIOR, R. (Ed.). ***Rhizoctonia solani*: biology and pathology**. Berkeley: University of California, 1970. p. 7-19.

RODRIGUES, A. A. C.; SILVA, G. S.; MORAES, F. H. R.; SILVA, C. L. P. *Arachis repens*: novo hospedeiro de *Puccinia arachidis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, n. 4, july/aug. 2006.

SABATO, E. de O.; PINTO, N. F. J. de A.; FERNANDES, F.T. **Identificação e controle de doenças na cultura do milho**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 198 p.

SARAN, P. E. **Manual de Identificação de Doenças do Algodoeiro**. 2014a. Disponível em: <https://www.fmcagricola.com.br/portal/manuais/bolso_doencas_algodoeiro/index.html#1>. Acesso em: 01 jul. 2014.

SARAN, P. E. **Manual de Identificação de Doenças da Soja**. 2014b. Disponível em: <https://www.fmcagricola.com.br/portal/manuais/doencas_soja/index.html#181/z>. Acesso em: 01 jul. 2014.

SHEW, B. B.; BEUTE, M. K.; CAMPBELL, C. L. Spatial pattern of southern stem rot caused by *Sclerotium rolfsii* in six North Carolina peanut fields. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, n. 6, 1290-1295, 1984.

SPEGAZZINI, C. L. *Puccinia arachidis* Speg. (n. sp.). In: WHITE, D. G.; DUNCAN, C. D.; AGUIRRE, D. E.; ARATA, P. N.; SPEGAZZINI, D. C. (Eds.). **Anales de la Sociedad Científica**. Buenos Aires, tomo XVII, 1º sem., 1884.

STANLEY, R. L.; SHOKES, F. M.; BERGER, D. A. First report of *Sclerotium rolfsii* on perennial peanut in Florida. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, n. 1, p. 105, jan. 1996. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PD-80-0105E>.

VON ARX, J. A. **The Genera of fungi sporulating in pure culture**. Vaduz: Verlag J. Cramer, 1981. 424 p.

WEBB, K. M.; HILL, A. L.; LAUFMAN, J.; HANSON, L. E.; PANELLA, L. Long-term preservation of a collection of *Rhizoctonia solani* using cryogenic storage. **Annals of Applied Biology**, New Jersey, v. 158, n. 3, p. 297-304, may 2011.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. do; COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: hortaliças**. Viçosa, MG: UFV, 2000. v. 2. 879 p.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. do; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: fruteiras**. Viçosa, MG: UFV, 2002. v. 1. 672 p.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. do; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: fruteiras**. Viçosa, MG: UFV, 2002. v. 2. 1312 p.

ZAUZA, E. A. V.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Eds.). **Métodos e Fitopatologia**. Viçosa: Editora UFV, 2007. p. 23-51.

Embrapa

Acre

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PÁTRIA EDUCADORA