

INFLUÊNCIA DE MEIOS DE CULTURA E PERÍODOS DE CRESCIMENTO NA ESPORULAÇÃO DE *SEPTORIA GLYCINES*¹

PAULO F. BERTAGNOLLI², ERLEI M. REIS³ e MIGUEL DALMO DE M. PORTO⁴

RESUMO - Com o objetivo de obter um meio de cultura que proporcione produção rápida e abundante de esporos de *Septoria glycines* (Hemmi), agente causal da mancha-parda-da-folha-da-soja, foi efetuado o presente trabalho. Inicialmente compararam-se fontes de carbono e de nitrogênio e substâncias reguladoras de crescimento. Posteriormente com base nos primeiros resultados alcançados, foram comparados os meios de cultura usados como testemunhas (Czapek ágar e BDA) agregados de fatores de crescimento nas doses que propiciaram a maior produção de esporos. Estes foram avaliados em cinco épocas de crescimento. Nos primeiros ensaios, os fatores de crescimento extrato de malte, extrato de levedura e tiamina, foram superiores aos meios básicos. No ensaio final, mantiveram-se com a máxima produção de esporos, nas cinco diferentes épocas de leitura efetuadas ao longo de 25 dias, os tratamentos contendo o fator de crescimento extrato de levedura. A maior produção de esporos foi obtida, quando a cultura alcançou 25 dias de desenvolvimento, com o tratamento Czapek ágar + 4 g/l de extrato de levedura.

Termos para indexação: nutrição, mancha-parda-da-folha-da-soja.

INFLUENCE OF CULTURE MEDIA AND GROWTH PERIODS ON THE SPORULATION *SEPTORIA GLYCINES*

ABSTRACT - The object of the present study was to find a new culture medium to provide rapid and abundant *Septoria glycines* (Hemmi) sporulation, the causal agent of brown spot disease on soybean leaves. First, carbon and nitrogen sources and growth regulators were compared. Latter, based on the first results obtained, the culture media used as checks, associated with growth factors in doses which resulted in the greatest spore production, were compared (Czapek agar and PDA). These were evaluated in five growth periods. In the first trials, the malt extract, yeast extract and thiamine growth factors were greater than the basic media. In the final trial, the treatments containing the yeast extract growth factor continued with the greatest spore production in the five different periods observed during 25 days. The greatest spore production was obtained when the culture reached 25 days of development, with the Czapek agar medium + 4 g/l of yeast extract.

Index terms: brown spot, nutrition.

INTRODUÇÃO

Não existem cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) resistentes ao fungo *Septoria glycines* Hemmi, agente causal da mancha-parda-da-folha-da-soja, (Lim 1979, Picinini 1978), moléstia responsável por decréscimos no rendimento de grãos de até 33,7%, segundo (Lim 1980). Para efetuar testes objetivando detectar resistência de cultivares, necessita-se de uma grande quantidade de inóculo deste microrganismo, obtido através de seu cultivo em um meio de cultura que proporcione condições ideais para sua esporulação. O meio de cultura de batata dextrose ágar (BDA) foi usado como substrato na obtenção do fungo por diversos autores (Lim 1979, 1980, Pataky & Lim 1981a, b, Ross 1982 e Young &

Ross 1979). Chegou-se à conclusão de que para este meio a maior produção de picnidiosporos ocorre quando o pH do meio é 6,0, o fotoperíodo é de luminosidade contínua, e a temperatura está entre 23°C a 30°C (Picinini 1978). São também citados outros meios de cultura na obtenção do fungo, tais como: farinha de milho, mandioca, vagens de soja esterilizadas (Wolf & Lehman 1926), e Sabouraud dextrose ágar (Benedict 1964). Além de teste comparando meios de cultura na produção de picnidiosporos do fungo, o qual, mostrou a superioridade do meio de Fries ágar (Bertagnolli et al. 1986). "Fator de crescimento", segundo Fries (1965), é uma substância orgânica que, em determinada quantia mínima, é indispensável para o crescimento de um fungo, não servindo simplesmente como uma fonte de energia. Entre as diferentes substâncias denominadas de "fator de crescimento" encontram-se vitaminas, aminoácidos, caseína hidrolizada e extratos de malte e levedura.

Robbins & Kavanach (1938), que estudaram o desenvolvimento de 38 espécies de fungos com a adição de tiamina a meio de cultura, mostraram va-

¹ Aceito para publicação em 14 de dezembro de 1987.

² Eng. - Agr., M.Sc., EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Trigo (CNPT), Caixa Postal 569, CEP 99100 Passo Fundo, RS.

³ Eng. - Agr., Ph.D., EMBRAPA/CNPT.

⁴ Eng. - Agr., Ph.D., Univ. Fed. do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

riações na resposta a esta vitamina ou a seus intermediários, pirimidina e tiazol, dependentes do fungo testado (Srinivasan & Vijayalakshmi 1960). Resposta semelhante foi verificada para *Glomerella tucumanensis*, pois com dose de 500 $\mu\text{g/l}$ de tiamina, foi constatado efeito inibidor, ao passo que em doses mais baixas, entre 50 a 200 $\mu\text{g/l}$, houve maior esporulação. Estes últimos autores também encontraram aumento do peso seco do micélio e esporulação deste fungo com doses de 4, 5 e 10 $\mu\text{g/l}$ de biotina.

Estudos efetuados por Ogoshi & Ui (1979), sobre a influência de vitaminas no crescimento de diversos isolados de *Rhizoctonia solani*, mostraram grande aumento de micélio com a presença de tiamina. No entanto, com adição das vitaminas biotina, pantotenoato de cálcio, riboflavina, ácido fólico, ácido p-aminobenzóico, inositol, ácido nicotínico e piridoxina, houve pequeno efeito estimulante do crescimento micelial deste fungo, com apenas algumas pequenas diferenças de intensidade neste desenvolvimento entre diferentes isolados.

Extrato de levedura foi fator de crescimento que, adicionado a meios de cultura, melhorou o crescimento de fungos com conseqüente aumento em sua esporulação (Kimati 1975, Loch 1978), ao passo que com o acréscimo de caseína hidrolizada conforme Loch (1978) foi constatado um desenvolvimento lento e com pouca esporulação de *Nomuraea rileyi*.

Adisa & Fajola (1982) demonstraram que fontes de carbono são importante fator no desenvolvimento micelial de fungos causadores da podridão de frutos, pois houve bom crescimento de *Aspergillus meleus* e *Penicillium citrinum* com o uso dos monossacarídeos glicose e frutose e oligossacarídeos sacarose e maltose. Em contraste, houve pouco desenvolvimento obtido com os polissacarídeos dextrina, amido, carboximetil-celulose e pectina.

Segundo Bean & Wilcoxson (1964), sacarose foi melhor fonte de carbono para *Helminthosporium sativum* e *Helminthosporium dictyoides* do que rafinose, galactose, xilose e lactose. Não houve diferenças no crescimento destes fungos quando substituíram a fonte de N do meio de Czapek ágar, nitrato de sódio, pelas substâncias: nitrato de amônio, sulfato de amônio, asparagina, metionina e hidrocloreto de tiamina.

O presente trabalho teve a finalidade de ajustar um meio de cultura que proporcionasse produção rápida e abundante de esporos de *S. glycines*.

MATERIAL E MÉTODOS

De dezembro de 1982 a março de 1983, foram realizados dez experimentos no Laboratório de Fitopatologia do Centro

Nacional de Pesquisa de Trigo - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CNPT-EMBRAPA) -, localizado em Passo Fundo, RS. O inóculo do fungo foi obtido a partir de diversas cultivares de soja, que apresentaram sintomas típicos da moléstia, coletados em lavouras próximas ao CNPT.

Para o preparo dos meios de cultura, os ingredientes de cada um foram pesados e colocados em frascos Erlenmeyer de 2 litros. O pH foi ajustado para 6,0 antes da esterilização (Picinini 1978). Para o controle de bactérias, usou-se sulfato de estreptomicina na dose de 200 $\mu\text{g/ml}$. De uma suspensão composta de 1×10^6 esporos/ml, espalhante e água esterilizada, empregou-se 1,5 ml para cada placa-de-Petri após a distribuição dos meios. As placas com o inóculo foram levadas para sala de crescimento, onde permaneceram a uma temperatura de 25°C e em regime de luz contínua (Almeida 1980, Picinini 1978).

Os primeiros oito experimentos, tendo o meio básico de Czapek ágar, constaram de testes de: fontes de C (frutose, galactose, glicose, maltose e sacarose), todas elas com 12,6 g de C por litro de água; fontes de N (nitrato de amônio, sulfato de amônio e nitrato de sódio), todos eles com 0,5 g de N por litro de água; doses de aminoácido asparagina (0, 1, 2, 4 e 6 g/l); doses da vitamina biotina (0, 2, 4, 6 e 8 $\mu\text{g/ml}$); doses da vitamina tiamina (0, 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{g/ml}$); doses de caseína hidrolizada (0, 2, 4, 6 e 8 g/l); doses de extrato de malte (0, 5, 10, 15 e 20 g/l); e doses de extrato de levedura (0, 1, 2, 4 e 6 g/l). Posteriormente, em um nono experimento, testou-se o extrato de levedura em meio de cultura de BDA nas doses de 0, 1, 2, 4 e 6 g/l. Finalmente, foram completados os testes iniciais com um experimento em que foram comparados os tratamentos que se destacaram nos testes anteriores: Czapek ágar + 400 $\mu\text{g/ml}$ de tiamina; Czapek ágar + 20 g/l de extrato de malte; Czapek ágar + 4 g/l de extrato de levedura; e BDA + 4 g/l de extrato de levedura. Estes foram confrontados com as testemunhas Czapek ágar e BDA e com o meio Fries ágar, o qual foi, em testes anteriores, o mais produtivo (Bertagnolli et al. 1986). Neste último experimento, avaliou-se a produção de picnidiosporos aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias de desenvolvimento da cultura.

Os tratamentos foram avaliados através da determinação do número de esporos produzidos por cm^2 com o auxílio de uma câmara de Neubauer. Em cada uma das quatro repetições, efetuou-se quatro vezes a leitura. Para isto, recortou-se um cilindro de 2,433 cm^2 de diâmetro em cada placa. A suspensão de esporos para as determinações foi obtida por lavagem e pincelamento superficial dos cilindros, procurando-se remover apenas os picnidiosporos. Os resultados obtidos, em esporos por ml, foram transformados para esporos por cm^2 . O delineamento experimental utilizado foi o completamente casualizado, usando-se o teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade, para comparação de médias.

RESULTADOS

A fonte de C frutose apresentou uma produção de esporos inferior à das outras quatro fontes: glicose, maltose, galactose e sacarose, as quais, por sua vez, foram significativamente iguais entre si (Tabela 1).

As fontes de N, nitrato de sódio, sulfato de amônio e nitrato de amônio mostraram os mesmos efeitos na produção de esporos em meio de Czapek ágar, não revelando superioridade de nenhum dos tratamentos testados (Tabela 2).

A inclusão do aminoácido asparagina ao meio de cultura de Czapek ágar não resultou num aumento da produção de esporos, nas doses utilizadas de 1, 2, 4 e 6 g/ml (Tabela 3).

O meio de Czapek ágar, sem e com a inclusão da vitamina biotina nas doses utilizadas de 2, 4, 6 e 8 µg/m de meio, permaneceu constante quanto à produção de esporos (Tabela 4).

A adição de caseína hidrolizada ao meio de Czapek ágar na dose de 2, 4, 6 e 8 g/l não proporcionou aumento na esporulação quando comparado com a testemunha. No entanto, entre as doses utilizadas, a menor, ou seja a de 2 g, foi inferior a 4, 6 e 8g de caseína hidrolizada por litro de meio de cultura (Tabela 5).

TABELA 1. Efeito de fontes de carbono no meio de cultura de Czapek ágar sobre a esporulação de *Septoria glycines*.

Tratamentos	Médias, esporos produzidos/cm ²
Glicose	146.424 a*
Maltose	143.922 a
Galactose	107.891 a
Sacarose	102.754 a
Frutose	41.114 b

* Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 2. Efeito de fontes de nitrogênio no meio de cultura de Czapek ágar sobre a esporulação de *Septoria glycines*.

Tratamentos	Médias, esporos produzidos/cm ²
Nitrato de sódio	89.910 a*
Sulfato de amônio	77.065 a
Nitrato de amônio	64.221 a

* Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 3. Efeito da suplementação de asparagina no meio de cultura de Czapek ágar sobre a esporulação de *Septoria glycines*.

Tratamentos	Médias, esporos produzidos/cm ²
Czapek ágar	89.910 a*
Czapek ágar + 2 g/l de asparagina	61.652 a
Czapek ágar + 4 g/l de asparagina	53.946 a
Czapek ágar + 6 g/l de asparagina	53.946 a
Czapek ágar + 1 g/l de asparagina	48.808 a

* Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 4. Efeito da suplementação de biotina no meio de cultura de Czapek ágar sobre a esporulação de *Septoria glycines*.

Tratamentos	Médias, esporos produzidos/cm ²
Czapek ágar	118.167 a*
Czapek ágar + 8 µg/ml de biotina	95.047 a
Czapek ágar + 2 µg/ml de biotina	89.910 a
Czapek ágar + 4 µg/ml de biotina	87.341 a
Czapek ágar + 6 µg/ml de biotina	87.341 a

* Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 5. Efeito da suplementação de caseína hidrolizada no meio de cultura de Czapek ágar sobre a esporulação de *Septoria glycines*.

Tratamentos	Médias, esporos produzidos/cm ²
Czapek ágar + 6 g/l de caseína hidrolizada	110.460 a*
Czapek ágar + 8 g/l de caseína hidrolizada	107.891 a
Czapek ágar + 4 g/l de caseína hidrolizada	102.754 a
Czapek ágar	95.047 ab
Czapek + 2 g/l de caseína hidrolizada	66.790 b

* Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

A vitamina tiamina adicionada ao meio de Czapek ágar mostrou ser fator importante na produção de esporos, pois todos os tratamentos utilizando este fator de crescimento mostraram-se superiores ao tratamento testemunha. O emprego de até 400 µg/ml ainda não foi suficiente para a obtenção da máxima resposta à esporulação (Fig. 1).

Os resultados mostram que, tanto os tratamentos que tinham 15 g quanto 20 g de extrato de malte por litro de meio de cultura foram iguais entre si e superiores aos demais tratamentos, os quais, por sua vez, não se diferenciaram na produção de esporos, ficando aqueles com 5 g e 10 g no mesmo grupo que a testemunha, que não foi suplementada com a adição deste fator de crescimento (Fig. 2).

Extrato de levedura foi um fator de crescimento que, adicionado ao meio de cultura Czapek ágar, superou a testemunha em todas as doses utilizadas, tanto com a adição de 1, 2, 4 como com a de 6 g/l (Fig. 3).

No ensaio de suplementação de extrato de levedura no meio de BDA, destacou-se o tratamento com a adição de 4 g/l de meio, o qual superou os demais na produção de esporos. Foi seguido pelo tratamento com 6 g, que também superou os restantes, ficando o tratamento com 2 g com produção de esporos igual aos tratamentos sem e com um grama (Fig. 4).

Pela Fig. 5, pode-se observar o desempenho dos tratamentos ao longo de um período de 25 dias.

O tratamento BDA ágar + 4 g/l de extrato de levedura teve um aumento na produção de esporos até 20 dias de desenvolvimento da cultura, decrescendo sua curva aos 25 dias.

Os tratamentos sem a adição de um dos fatores de crescimento (extrato de levedura, tiamina e extrato de malte) foram sempre inferiores aos tratamentos que levaram algum fator de crescimento, com exceção da leitura efetuada aos cinco dias, quando somente BDA + 4 g/l de extrato de levedura foi superior aos demais, permanecendo os tratamentos Czapek ágar + 400 µg/ml de tiamina, Czapek ágar + 4 g/l de extrato de levedura e Czapek ágar + 20 g/l de extrato de malte, num grupo intermediário, junto com BDA e Fries ágar (Tabela 6).

O tratamento Czapek ágar, usado como testemunha, sempre esteve no grupo inferior.

Czapek ágar + 400 µg/ml de tiamina e Czapek ágar + 20 g/l de extrato de malte obtiveram produções semelhantes nas quatro primeiras datas de leitura ao longo do período de desenvolvimento das culturas. Estes tratamentos, apesar de terem sido

inferiores a no mínimo um tratamento daqueles acrescidos do fator de crescimento extrato de levedura na dose de 4 g/l, por sua vez sempre foram superiores aos considerados testemunhas, Fries ágar, BDA e Czapek ágar, a não ser quando da leitura efetuada aos cinco dias, quando estes tratamentos foram iguais ao Fries e BDA, superando somente a testemunha Czapek ágar.

Nota-se que os tratamentos que continham o fator de crescimento extrato de levedura na dose de 4 g/l, tanto em meio de Czapek ágar quanto em BDA, foram os tratamentos que mais se destacaram, mantendo-se ambos com as máximas produções de esporos, revezando-se no pico da produção. O meio BDA + 4 g/l de extrato de levedura foi superior aos cinco e aos quinze dias, enquanto Czapek ágar + 4 g/l de extrato de levedura foi superior na produção de esporos aos 25 dias, permanecendo ambos os tratamentos no topo da curva aos dez e aos vinte dias (Tabela 6).

DISCUSSÃO

Os resultados alcançados quanto a fontes de C estão de acordo com Stanier et al. (1969), segundo os quais as fontes de C utilizadas por microrganismos são variáveis e dependentes da capacidade destes em decompor os compostos orgânicos e em sintetizar substâncias complexas a partir de unidades mais simples. Esses resultados estão de acordo também com Adisa & Fajola (1982), que concluem existirem diferenças de aptidão entre microrganismos quanto à obtenção de energia a partir de diferentes fontes de carbono.

Nossos resultados sobre fontes de N são semelhantes aos obtidos por Bean & Wilcoxson (1964) quanto ao efeito de formas de N na esporulação de fungos, os quais testaram, na nutrição de *Helminthosporium sativum* e *H. dictyoides*, além destas três fontes de N (nitrato de sódio, sulfato de amônio e nitrato de amônio), as outras: asparagina, metionina e hidrocloreto de tiamina, sem encontrar diferenças entre estas fontes.

Asparagina, segundo Ingold (1973), pode servir como uma fonte orgânica de N e de C para alguns microrganismos. Este aminoácido foi testado, no presente trabalho, como um fator de crescimento acrescido a uma fonte de N e a uma de C já existente no meio testemunha, fato, este, que pode explicar o não-aumento na produção de picnidiosporos do fungo.

TABELA 6. Efeito de meios de cultura e do período de crescimento na multiplicação de *Septoria glycines*.

Tratamentos	Esporos produzidos/cm ² x 10 ⁵ (dias)				
	5	10	15	20	25
Czapek ágar + 4 g/l extrato de levedura	29,5 b*	201,7 a	295,4 b	430,0 a	611,4 a
BDA + 4 g/l de extrato de levedura	94,4 a	191,4 a	355,1 a	452,1 a	336,5 c
Czapek ágar + 400 µg/ml de tiamina	18,6 b	131,9 b	245,3 bc	283,2 b	444,4 b
Czapek ágar + 20 g/l de extrato de malte	30,8 b	103,4 b	192,7 c	226,1 b	282,6 c
BDA	36,0 b	48,2 c	53,9 de	83,5 c	118,2 d
Fries ágar	22,5 b	27,0 cd	112,4 d	53,3 cd	49,5 e
Czapek ágar	1,0 c	1,3 d	1,4 e	1,8 d	1,7 e

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

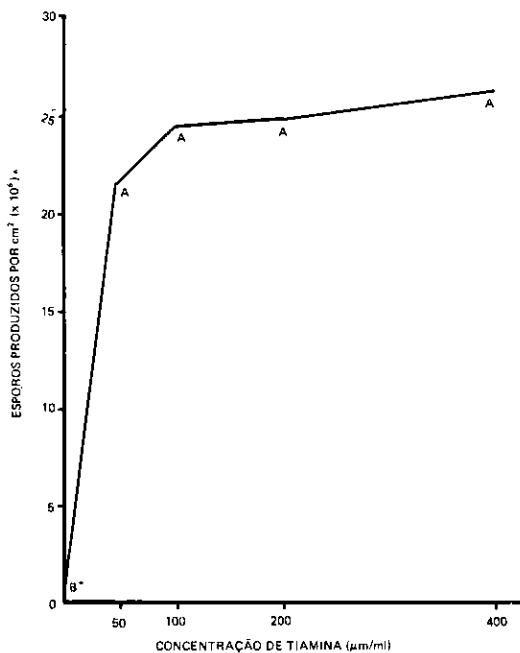


FIG. 1. Efeito da suplementação de tiamina no meio de cultura de Czapek ágar sobre a esporulação de *Septoria Glycines*.

* Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

Biotina demonstrou ser importante fator de crescimento para *Glomerella tucumanensis* no desenvolvimento de massa seca de micélio e esporulação, conforme Srinivasan & Vijayalakshmi (1960), também o sendo para *C. falcatum* e *C. graminicola* isolados de cana-de-açúcar, pois somente houve crescimento destes fungos quando no meio mínimo existia

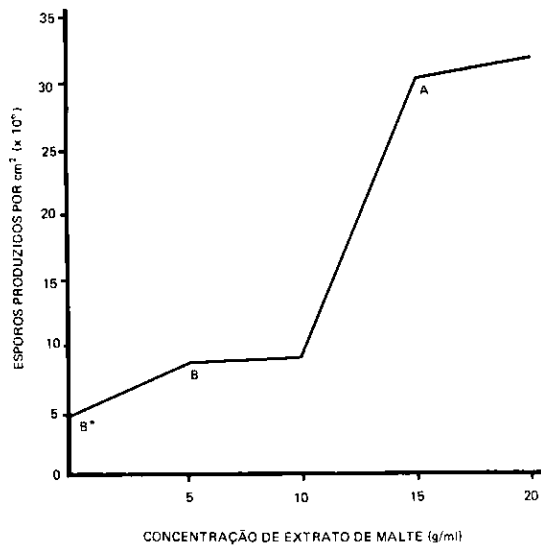


FIG. 2. Efeito da suplementação de extrato de malte no meio de cultura de Czapek ágar sobre a esporulação de *Septoria glycines*.

* Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

biotina (Kimati 1975). Os resultados alcançados no presente trabalho estão de acordo com os de Ogoshi & Ui (1979), que não encontraram resposta de *Rhizoctonia solani* à presença desta vitamina no meio de cultura testado.

Com o emprego de 1,5 g/l de caseína hidrolizada em meio mínimo, houve apenas resposta pouco saliente no desenvolvimento de micélio e na esporulação de *N. rileyi*. No entanto, segundo Loch (1978), não foi constatado desenvolvimento do fungo em meio mínimo sem a presença deste fator.

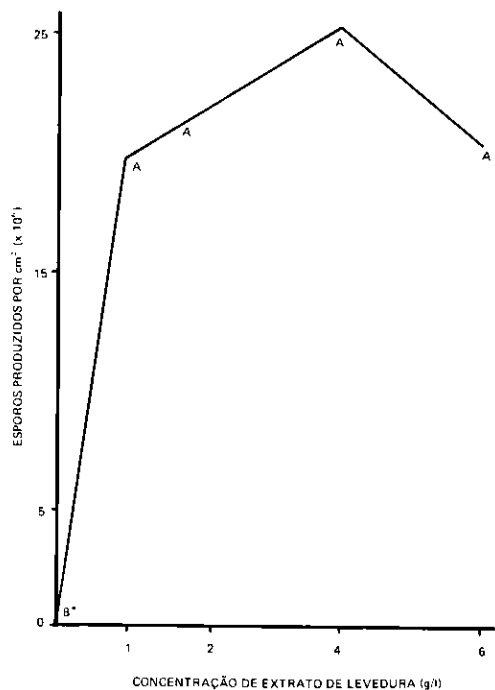


FIG. 3. Efeito de suplementação de extrato de levedura no meio de cultura de Czapek ágar sobre a esporulação de *Septoria glycines*.

* Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

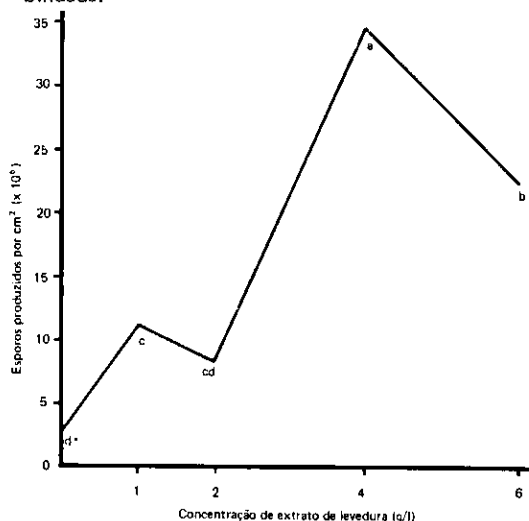


FIG. 4. Efeito da suplementação de extrato de levedura em meio de cultura de BDA sobre a esporulação de *Septoria glycines*.

* Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

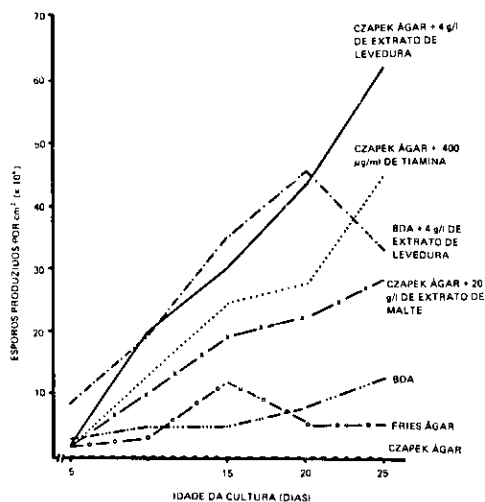


FIG. 5. Efeito de meios de cultura e do período de esporulação na multiplicação de *Septoria glycines*.

Os aumentos de esporulação obtidos com o uso de tiamina no presente trabalho estão de acordo com os alcançados por Robbins & Kavanach (1938), Srinivasan & Vijayalakshmi (1960) e Ogoshi & Ui (1979), os quais demonstraram ser este um importante fator de crescimento para a maioria dos fungos testados. Como a tiamina é integrante da composição de extrato de levedura, é possível que seja este um dos principais fatores responsáveis pela resposta do extrato de levedura em incrementar a esporulação do fungo em teste. Confirmam os resultados aqui alcançados, os trabalhos realizados por Kimati (1975) com *C. falcatum* e por Loch (1978) com *N. rileyi*, os quais demonstraram ser o extrato de levedura um importante fator de crescimento e esporulação destes fungos. Ainda, segundo Loch (1978), o extrato de levedura tem algum fator, em sua constituição, que favorece o crescimento e esporulação de *N. rileyi*. Este extrato, sendo um complexo de substâncias que, entre outros fatores, contém uma série de vitaminas, complementa o meio de BDA e principalmente o de Czapek ágar, proporcionando a eles condições ótimas para esporulação de *S. glycines*.

O decréscimo da produção de picnidiosporos do tratamento BDA + 4 g/l de extrato de levedura aos 25 dias de desenvolvimento da cultura ocorreu provavelmente porque o meio de cultura apresentava-se visivelmente seco, comparado aos demais tratamen-

tos. Acredita-se que a curva poderia continuar crescente caso houvesse sido utilizada maior quantidade de meio de cultura por placa.

Baseados em resultados anteriores, Bertagnolli et al. (1986), chega-se a conclusão de que neste trabalho o tratamento Fries ágar, com exceção da leitura efetuada aos 15 dias de desenvolvimento da cultura, obteve uma produção de esporos aquém daquela esperada para este tratamento. Provavelmente esta baixa produção de esporos ocorreu devido a condições adversas de ambiente e/ou nutrição, as quais levaram a produzir mais micélio do que esporos. Como os tratamentos foram avaliados pela produção de esporos e não pela quantidade de micélio, provavelmente este tratamento tenha sido prejudicado.

As condições para a produção de esporos, segundo Riker & Riker (1936), são aquelas mais ou menos adversas ao crescimento vegetativo. Entre as condições favoráveis à produção de esporos, estes autores citam: reduções das fontes de C e N do meio; incubação sob condições de flutuação de temperatura; longo período de incubação; e dessecação gradual do meio. Pelo descrito acima, podemos supor que o meio de cultura Fries ágar recebeu nutrientes e condições de ambiente ideais para o desenvolvimento de micélio de *S. glycines* em detrimento da multiplicação de esporos.

REFERÊNCIAS

- ADISA, V.A. & FAJOLA, A.O. Carbon nutrition of six fruit rot pathogens of *Citrus sinensis*. **Fitopatol. bras.**, 7(3):359-63, 1982.
- ALMEIDA, A.M.R. Reação de cultivares e linhagens de soja a *Septoria glycines*. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Londrina, PR. **Resultados de pesquisa de soja 1979/80**. Londrina, 1980. p.107-12.
- BEAN, G.A. & WILCOXSON, R.D. Helminthosporium leaf spot of bluegrass. **Phytopathology**, 54(9):1065-70, 1964.
- BENEDICT, W.G. Studies on the effect of *Pseudomonas glycinea* on *Septoria glycines* development on foliage of the Harosoy soybean grown under controlled environmental conditions. **Can. J. Bot.**, 42:1135-41, 1964.
- BERTAGNOLLI, P.F.; PORTO, M.D. de M.; REIS, E.M. Influence of culture media on the sporulation of *Septoria glycines* Hemmi; causal agent of soybean brown spot. **Pesq. agropec. bras.**, 21(6):615-8, 1986.
- FRIES, N. The chemical environment for fungal growth. In: AINSWORTH, G.C. & SUSSMAN, A.S. **The fungi**; an advanced treatise. New York, Academic, 1965. v.1, Cap. 19, p.491-523.
- INGOLD, C.T. Nutrition of fungi. In: ———. **The biology of fungi**. 2.ed. London, Hutchinson Educational, 1973. p.34-9.
- KIMATI, H. **Taxonomia, esporulação e patogenicidade de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. (sensu Arx, 1957)**. Piracicaba, ESALQ, 1975. 103p. Tese Doutorado.
- LIM, S.M. Brown spot severity and yield reduction in soybean. **Phytopathology**, 70(10):974-7, 1980.
- LIM, S.M. Evaluation of soybean for resistance to *Septoria* brown spot. **Plant Dis. Rep.**, 63(3):242-5, 1979.
- LOCH, L.C. **Exigências nutricionais e ambientes do fungo entomógeno *Nomuraea rileyi* (farlow) Samson e seu comportamento na presença de defensivos agrícolas**. Piracicaba, ESALQ, 1978. 65p. Tese Doutorado.
- OGOSHI, A. & UI, T. Specificity in vitamin requirement among anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. **Ann. Phytopathol. Soc. Jap.**, 45(1):47-53, 1979.
- PATAKY, J.K. & LIM, S.M. Effects of *Septoria* brown spot on the yield components of soybeans. **Plant Dis.**, 65(7):588-90, 1981a.
- PATAKY, J.K. & LIM, S.M. Efficacy of benomyl for controlling *Septoria* brown spot of soybeans. **Phytopathology**, 71(4):438-42, 1981b.
- PICININI, E.C. **Obtenção de inóculo e reação de algumas cultivares e linhagens de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivadas no Brasil à "mancha-parda" (*Septoria glycines* Hemmi)**. Porto Alegre, UFRGS, 1978. 59p. Tese Mestrado.
- RIKER, A.J. & RIKER, R.S. Isolation, culture, and inoculation. In: ———. **Introduction to research on plant diseases; a guide to principles and practice for studying various plant-disease problems**. Madison, University of Wisconsin, 1936. Cap. 5, p.44-58.
- ROBBINS, W.J. & KAVANACH, F. Vitamin B₁ or its intermediates and growth of certain fungi. **Am. J. Bot.**, 25(4):229-36, 1938.
- ROSS, J.P. Effect of simulated dew and postinoculation moist periods on infection of soybean by *Septoria glycines*. **Phytopathology**, 72(2):236-38, 1982.
- SRINIVASAN, K.V. & VIJAYALAKSHMI, U. Thiamine and biotin requirements of two strains of *Glomerella tucumanensis* (Speg.) Arx and Mueller. **Curr. Sci.**, 29(3):103-4, 1960.
- STANIER, R.Y.; DOUDOROFF, M.; ADELBERG, E.A. Nutrição e fisiologia microbiana. In: ———. **Mundo dos micróbios**. São Paulo, E. Blücher, 1969. cap. 13, p.277-97.
- WOLF, F.A. & LEHMAN, S.G. Brown-spot disease of soybean. **J. Agric. Res.**, 33(4):365-74, 1926.
- YOUNG, L.D. & ROSS, J.P. Brown spot development and yield response of soybean inoculated with *Septoria glycines* at various growth stages. **Phytopathology**, 69(1):8-11, 1979.