



**USO DA RESTRIÇÃO HÍDRICA
NA INOCULAÇÃO DE
Colletotrichum lindemuthianum EM SEMENTES
DE FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

JOÃO CUSTÓDIO BARBOSA DE CARVALHO

65294

084

1999

CAÇÃO E EM
A DE J EVO

48084

MTN 33632

JOÃO CUSTÓDIO BARBOSA DE CARVALHO

USO DA RESTRIÇÃO HÍDRICA NA INOCULAÇÃO DE *Colletotrichum lindemuthianum* EM SEMENTES DE FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de "Mestre".

BIBLIOTECA CENTRAL - UFLA



48084

Orientador
Prof. José da Cruz Machado

BIBLIOTECA CENTRAL

N.º CLAS.

UFLA
4835.65294

CAR

N.º REGISTRO

UFLA
48084

DATA

08/02/2000

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

1999

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Carvalho, João Custódio Barbosa de

Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) / João Custódio Barbosa de Carvalho. – Lavras : UFLA, 1999.

98 p. : il.

Orientador: José da Cruz Machado.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Potencial hídrico. 2. Polietileno glicol. 3. Manitol. 4. *Colletotrichum lindemuthianum*. 5. Crescimento micelial. 6. Semente. 7. Inoculação. 8. Germinação. 9. Feijão I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.65294

-589.24

JOÃO CUSTÓDIO BARBOSA DE CARVALHO

USO DA RESTRIÇÃO HÍDRICA NA INOCULAÇÃO DE *Colletotrichum lindemuthianum* EM SEMENTES DE FEJJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

Aprovada em 13 /09 /1999

Prof.ª Maria das Graças G. C. Vieira UFLA

Prof. Júlio Silvío de Sousa Bueno Filho UFLA

Prof. Renato Mendes Guimarães UFLA


Prof. José da Cruz Machado

UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Ao meu avô,
Custódio de Carvalho e,
aos meus pais,
Custódio José de Carvalho e Maria Amélia B. de Carvalho,
exemplos de fé, dedicação e trabalho.

OFEREÇO

À sra. Aparecida Candida Marques,
à minha esposa Vania,
e aos meus filhos João Gabriel e Pedro,
pelo amor, carinho e compreensão.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Universidade Federal de Lavras-UFLA, em especial ao Departamento de Agricultura, pela oportunidade concedida para realização do curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor José da Cruz Machado, pela orientação e ensinamentos.

À professora Maria das Graças G. C. Vieira, pela co-orientação.

Aos professores Renato Mendes Guimarães, Luiz Edson Mota de Oliveira e à professora Angela Maria Soares, pelas valiosas sugestões.

Aos professores Júlio Sílvio de Sousa Bueno Filho, Daniel Furtado Ferreira, e ao colega Carlos Alberto da Silva Ledo, pela ajuda nas análises estatísticas.

A Wirton Macedo Coutinho, Flávio Henrique Linhares Magalhães, Robério Anastácio Ferreira e Rogério Amaro Gonçalves e aos demais colegas de curso, pelo apoio, incentivo e amizade.

A Hélia Alves de Mendonça, Maria Cristina Mendes Costa e Maria Gabriela Roca Magallanes, pelos isolados fúngicos.

Aos funcionários da biblioteca, do Laboratório de Análise de Sementes, e do Laboratório de Patologia de Sementes, pela consideração e convivência.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Qualidade de sementes de feijoeiro em relação à <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	3
2.2 Metodologias de inoculação de fungos em sementes.....	6
2.3 Fundamentos de relações hídricas em um sistema biológico.....	11
2.4 Germinação e restrição hídrica em sementes.....	14
2.5 Crescimento de fungos em condições de stress hídrico.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Origem e caracterização das sementes.....	23
3.2 Obtenção e multiplicação do inóculo.....	24
3.3 Preparo do meio de cultura básico e restrição hídrica.....	25
3.4 Primeira etapa: Pré-condicionamento de sementes de feijoeiro em relação à restrição hídrica do substrato agarizado.....	27
3.4.1 Tratamentos e instalação do ensaio.....	27
3.4.2 Avaliações.....	27
3.4.3 Análise estatística.....	28
3.5 Segunda etapa: Crescimento micelial de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> em relação à restrição hídrica do substrato agarizado.....	29
3.5.1 Tratamentos e instalação do ensaio.....	29
3.5.2 Avaliações.....	29
3.5.3 Análise estatística.....	30
3.6 Terceira etapa: Uso da restrição hídrica no processo inoculação de <i>Colletotrichum. lindemuthianum</i> em sementes de feijoeiro.....	30

3.6.1	Tratamentos e instalação do ensaio.....	30
3.6.2	Avaliações.....	31
3.6.2.1	Grau de umidade.....	31
3.6.2.2	Sanidade e localização do inóculo	32
3.6.2.3	Germinação das sementes e transmissibilidade de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> em condições de laboratório.....	33
3.6.2.4	Emergência de plântulas em solo / areia e transmissibilidade de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> pelas sementes.....	34
3.6.3	Análise estatística.....	34
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1	Primeira etapa: pré-condicionamento de sementes de feijoeiro em relação à restrição hídrica do substrato agarizado.....	36
4.2	Segunda etapa: Crescimento micelial de <i>C. olletotrichum lindemuthianum</i> em relação à restrição hídrica do substrato agarizado.....	44
4.3	Terceira etapa: Uso da restrição hídrica na inoculação de <i>Colletotrichum. lindemuthianum</i> em sementes de feijoeiro.....	49
4.3.1	Índice de ocorrência e localização de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> nas sementes de feijoeiro inoculadas	54
4.3.2	Germinação das sementes e transmissibilidade de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> em condições de laboratório.....	60
4.3.3	Emergência de plântulas em solo / areia e transmissibilidade de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> pelas sementes.....	65
5.	Conclusões.....	71
6.	Considerações gerais.....	73
7.	Referências bibliográficas.....	75
8.	Anexo.....	89

RESUMO

CARVALHO, João Custódio Barbosa de. Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia)*

A presente pesquisa teve como objetivo principal desenvolver metodologia eficiente de inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro, sendo conduzida em três etapas: 1) estudo da emissão de radículas de sementes de feijoeiro, em função da desinfestação (hipoclorito de sódio por 1 minuto), do período de exposição (24, 48, 72, 120 e 168 horas) e da restrição hídrica do BDA (testemunha), modificado pela adição de soluções de PEG 6.000 ou manitol, em quatro níveis de restrição hídrica [-0,4, -0,6, -0,8 e -1 (MPa)], à temperatura de 20°C e na ausência de luz; as sementes dos tratamentos nos quais não houve emissão de radículas (após 168 horas de exposição), foram lavadas, secas e submetidas ao teste de germinação; 2) estudo do crescimento de colônias de *C. lindemuthianum* nos mesmos tipos de substratos utilizados na primeira etapa, nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo alternado de 12 horas; 3) efeito de diferentes períodos de exposição de sementes de feijoeiro (30, 72, 120 e 168 horas) a BDA + manitol (-1 MPa) e a BDA (testemunha) por 30 horas (20°C e escuro contínuo), na presença (inoculação) e na ausência (controle) de imicélio de *C. lindemuthianum* aos cinco dias de idade. Foi observado que restrições hídricas de -0,8 e -1 MPa do BDA, pelo uso de manitol, e de -1 MPa, pelo uso de PEG 6.000, foram eficientes em inibir a emissão de radículas, tanto de sementes desinfestadas como não desinfestadas. Entretanto, o desempenho das sementes não desinfestadas, pré-condicionadas sobre BDA + manitol (-1 MPa) durante 168 horas, foi superior ao desempenho daquelas pré-condicionadas em BDA + PEG 6.000 (-1 MPa), pelo mesmo período de tempo. Já o diâmetro médio das colônias de *C. lindemuthianum*, crescidas em BDA + manitol, superou os valores observados em BDA (testemunha) e em BDA + PEG 6.000, nos diferentes níveis de potenciais hídricos testados. O aumento do período de exposição de sementes de feijoeiro ao inóculo de *C. lindemuthianum* em substrato BDA + manitol (-1 MPa), mostrou-se como uma técnica adequada para aumentar a eficiência do processo de infecção das sementes pelo referido patógeno, resultando em aumento da transmissibilidade do patógeno para as plântulas, bem como do grau de associação do patógeno com as sementes, podendo ser secas e utilizadas para diversas finalidades.

*Comitê Orientador: José da Cruz Machado - UFLA (Orientador). Maria das Graças G.C. Vieira – UFLA.

ABSTRACT

Carvalho, João custódio Barbosa de . Use of water restriction in the inoculation of *Colletotrichum lindemuthianum* in seed of bean plant (*Phaseolus vulgaris* L.) (Dissertation - Master in Plant Science)*

The present research was carried out aiming at to develop a more efficient methodology to inoculate *Colletotrichum lindemuthianum* in bean seeds by using the hidric restriction principle. The research work was conducted in tree steps. In the fist part, the effect of different hidric restriction levels on PDA medium amended with PEG 6,000 or mannitol on the seed radicle emission was investigated. In the second step growth of *C. lindemuthianum* on PDA containing the PEG 6,000 or mannitol was measured. The third part of the work consisted of evaluating the infection level obtained by keeping the bean seeds in contact with colonies of *C. lindemuthianum*, 5 days old, developed on PDA medium amended with mannitol at different concentrations. The results showed that incorporation of mannitol solution at -1MPa into PDA medium with 5 day incubation, proved to be efficient to obtain higher levels of bean seeds infected by the anthracnosis fungous. Growth of *C. lindemuthianum* was not affected by the hidric restriction produced by the addition of mannitol, at the maximum level of -1,0 MPa, into PDA medium. Incorporation of solutions of PEG 6,000 at hidric restrictions higher than -0,6 MPa into PDA caused reduction in the development of *C. lindemuthianum*. Radicle emission of bean seeds was efficiently impeded on PDA medium containing such components, at hidric restriction levels of -1MPa for 168 hours.

*Guidance Committee: José da Cruz Machado - UFLA (Major Professor), Maria das Graças G. C. Vieira – UFLA.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de métodos eficazes e confiáveis para infectar sementes é de grande utilidade em patologia de sementes. Sementes infectadas são necessárias, por exemplo, para o desenvolvimento de tecnologias, visando a detecção e o controle de patógenos transmitidos por sementes, em estudos epidemiológicos das doenças resultantes da associação destes com as sementes, e em outros estudos e demonstrações que fazem uso de sementes com patógenos. A grande dificuldade em obter níveis adequados de patógenos em sementes, como por exemplo, *Diplodia maydis* em sementes de milho, *Diaporthe sojae meridionalis* e *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja, e *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro, tem gerado a necessidade do desenvolvimento de métodos de inoculação desses fungos em sementes, visando à condução de estudos que tratam desse tipo de interação. Os métodos atuais consistem na inoculação de plantas adultas, imersão de sementes em suspensão de esporos e no método de expor as sementes a colônias dos fungos em desenvolvimento. No entanto, a eficiência destes métodos é questionada pelo grande número de fatores que podem interferir na transmissão do patógeno da planta para a semente, no caso da inoculação de plantas adultas, e, no caso de inoculação das sementes em pós-colheita, por ocasionar danos às sementes em embebição, ou mesmo resultar na germinação das sementes, inviabilizando a secagem das mesmas para utilização posterior. Os métodos conhecidos para inocular *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro revelam baixa eficiência no sentido de se obter índices satisfatórios de transmissibilidade do patógeno para as plântulas (Oliveira, 1991), ou mesmo mostram-se ineficientes em evidenciar os efeitos do patógeno nas sementes (Silva, 1997). O presente trabalho teve como objetivo principal desenvolver

metodologia eficiente para se obter infecção de sementes de feijoeiro por *Colletotrichum lindemuthianum*, lançando mão do princípio da restrição hídrica.

Foram objetivos específicos:

- a avaliação da influência da restrição hídrica na germinação de sementes de feijoeiro, incubadas sobre substrato agarizado durante sete dias;
- a avaliação da influência da restrição hídrica do substrato agarizado no crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum*;
- a avaliação da influência da restrição hídrica do substrato agarizado no processo de infecção de sementes de feijoeiro por *Colletotrichum lindemuthianum*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Qualidade de sementes de feijoeiro em relação a *Colletotrichum lindemuthianum*

O termo, qualidade de sementes, pode ser definido de várias maneiras, dependendo do contexto que se examina. Normalmente, qualidade envolve algum atributo ou característica da semente, e um padrão pré - estabelecido.

Para Popinigis (1977), a qualidade da semente é o somatório de todos os atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários, que afetam a capacidade desta em originar plantas de alta produtividade. No processo de produção de sementes, os atributos de qualidade são adquiridos na fase de campo período em que é possível adotar medidas preventivas e corretivas, com intuito de manter ou preservar as características da semente.

A qualidade fisiológica da semente representa a capacidade desta em desempenhar funções vitais, caracterizada pela germinação, vigor e longevidade (Popinigis, 1977). A qualidade sanitária refere-se à presença de microrganismos associados às sementes, inclusive a presença de insetos (Menten, 1986).

A alta umidade das sementes, associada à presença de microrganismos e a altas temperaturas, são os principais fatores responsáveis pela aceleração dos processos deteriorativos das sementes, podendo causar rápida perda de vigor e viabilidade das mesmas (Agarwal e Senclair, 1987; Bewley e Black, 1994). Fungos não crescem em sementes que se encontram em equilíbrio com a umidade relativa do ambiente abaixo de 68% (Bewley e Black, 1994).

Em geral, os danos causados por patógenos às sementes, são vistos como deformações, apodrecimento, estromatizações, manchas necróticas e descoloração da casca, que levam sempre à perda do poder germinativo, e constituem focos primários de infecção no campo (Lucca Filho, 1985;

Machado, 1988).

De acordo com Menezes (1985), a maior parte dos agentes causais das principais doenças que afetam a cultura do feijoeiro, são transmitidos por sementes. Entre tais agentes encontram-se os fungos: *Colletotrichum lindemuthianum*, *Phaeoisariopsis griseola*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* incluindo-se *F. oxysporum* f. sp. *Phaseoli*, *F. solani* f. sp. *Phaseoli*, *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Destacam-se também, bacterias fitopatogênicas dos gêneros *Xanthomonas* e *Pseudomonas*, além de alguns vírus (Kimati, 1980; Rava, Vieira, Costa, et al. 1981).

A antracnose do feijoeiro, cujo agente causal é o fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, é uma doença de grande importância em praticamente todas as partes do mundo, principalmente em regiões de clima temperado e subtropical, podendo causar perdas de até 100% quando utilizam-se sementes severamente infectadas e de cultivar suscetível, sob condições favoráveis ao desenvolvimento da doença (Maffia, Carmo e Katsurayama, 1988).

Colletotrichum lindemuthianum pode sobreviver na semente como micélio dormente no tegumento e cotilédones, e na forma de esporos entre os cotilédones, constituindo a semente, o principal mecanismo de sobrevivência e de dispersão desse patógeno (Maffia, Carmo e Katsurayama, 1988).

Sementes infectadas por *Colletotrichum lindemuthianum* apresentam lesões levemente deprimidas, de tamanhos variáveis e de coloração parda a negra, ou muitas vezes podem não apresentar sintomas (Kimat, 1980). As sementes infectadas originam lesões nos cotilédones das plântulas, hipocótilos, ou folhas primárias, que podem atuar como fonte de inóculo secundário no campo de produção (Kimat, 1980; Machado, 1988). Em geral, as lesões são caracteristicamente pardo-escuras, com contornos pardo-avermelhados, e quando as condições de umidade e temperatura são favoráveis, forma-se uma massa de esporos de coloração rosada ao centro das lesões (Chaves, 1980;

Kimat, 1980).

O grau de transmissão de *Colletotrichum lindemuthianum* por sementes de feijoeiro, aumenta com a severidade da infecção e com fatores que favorecem o crescimento micelial do patógeno nos tecidos infectados (Tu, 1992). De acordo com Bianchini, Maringoni e Carneiro (1997), o desenvolvimento da antracnose é favorecido por temperaturas entre 13 e 27 °C, com o ótimo a 21°C, e umidade relativa acima de 91%.

Deste modo, a identificação dos microrganismos em associação com as sementes, por testes de sanidade, pode servir como subsídio para tomadas de decisões que visam atenuar a ação negativa dos patógenos sobre a qualidade das sementes (Tanaka e Machado, 1985; Machado, 1988).

O método de incubação das sementes em papel de filtro (“blotter test”), e o método do rolo de papel-toalha são testes de sanidade recomendados pela International Seed Testing Association (ISTA, 1976) para avaliar a qualidade sanitária de sementes de feijoeiro. Menezes e Mohan (1982a) compararam a eficiência desses dois métodos para detecção de *Fusarium* spp, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*, e concluíram que, o método de incubação das sementes em papel de filtro, foi mais eficiente e adequado. Para a detecção de *Colletotrichum lindemuthianum*, o método de papel de filtro foi capaz de detectar 14% de amostras de sementes de feijoeiro infectadas, 6,5 de porcentagem máxima de infecção, por amostra, e um total de 0,18% de sementes infectadas nas amostras analisadas. Por sua vez, os valores encontrados pelo método do papel toalha foram de 12%, 5,0% e 0,14%, respectivamente, para os mesmos parâmetros, anteriormente citados. Salienta-se que, o método de papel de filtro nem sempre é capaz de informar sobre a patogenicidade dos fungos constatados, uma vez que vários patógenos não são capazes de produzir sintomas na fase inicial de desenvolvimento (Machado, 1988).

A baixa interferência de *Colletotrichum lindemuthianum*, na germinação das sementes (Patrício, Borim e Ortolani, 1991), confere à semente um eficiente meio de sobrevivência e de transmissão deste patógeno à progênie. Menezes e Mohan (1982b) observaram que sementes com manchas típicas de antracnose, apresentaram em média 83% de ocorrência de *Colletotrichum lindemuthianum* e, uma taxa de germinação de 82%. Sugeriram ainda que, a seleção visual das sementes de feijoeiro, descartando-se as sementes enrugadas, mal formadas, danificadas, com manchas típicas de antracnose ou outros tipos de manchas, apresenta-se como uma técnica eficiente e viável para reduzir o potencial de inóculo dos principais patógenos transmitidos por sementes de feijoeiro, principalmente *Colletotrichum lindemuthianum*.

Menten (1978) observou uma relação inversa entre a incidência de microrganismos como *Fusarium*, *Macrophomina* e *Rhizoctonia*, em sementes de feijoeiro, e os resultados de testes de vigor e de germinação. Neste sentido, em estudos envolvendo o efeito de patógenos sobre a germinação de sementes, Machado (1988) salienta que, é fundamental conhecer não só a condição sanitária, como também o perfil fisiológico completo do lote em estudo, pois lotes com diferentes níveis de deterioração podem apresentar diferentes tipos de respostas ao teste de germinação, dependendo dos microrganismos presentes no lote. O conhecimento do tipo e da posição do inóculo nas sementes, também é de grande importância pois, não só permite definir os métodos mais adequados para a detecção de patógenos em sementes, como também permite estimar o modelo de desenvolvimento das doenças no campo.

2.2 Metodologias de inoculação de fungos em sementes

A inoculação de fungos em plantas ou partes de plantas, é um artifício bastante utilizado por pesquisadores, com vistas ao desenvolvimento de estudos que envolvem os vários aspectos da interação entre o patógeno e o hospedeiro.

O procedimento de aplicar suspensões de esporos em plantas é comum em estudos envolvendo aspectos de resistência de plantas a doenças, e de transmissibilidade de fungos pelas sementes (Machado e Carvalho, 1975; Bastos e Porto, 1982; Lima, Carvalho e Carvalho, 1985; Araújo, 1988; Tanaka e Menten, 1992; Pizzinato e Fuzatto 1994), constituindo um método prático para os fungos que esporulam facilmente em condições de laboratório, além de permitir padronização no preparo e na aplicação do inóculo.

De acordo com Machado e Carvalho (1975), a inoculação de *Colletotrichum truncatum* em plantas de diferentes cultivares de soja, 30 a 35 dias após a floração, proporcionou índices de 18% a 40% de ocorrência do referido fungo, nas sementes colhidas ao final do ciclo da cultura, avaliada pelo plaqueamento destas em meio BDA.

Já a inoculação de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, em plantas de diferentes cultivares de algodão, no estágio fenológico de maçãs formadas, proporcionou índices de 1,5% a 11,5% de ocorrência do referido fungo nas sementes produzidas, avaliadas pelo método do papel de filtro. Quando estas sementes foram plantadas, proporcionaram de 1% a 6,5% de plântulas com sintomas de ramulose (Tanaka e Menten, 1992).

Bastos e Porto (1982) inocularam *Colletotrichum lindemuthianum* em vagens de dois cultivares de feijoeiro, nos estádios de formação das sementes, sementes formadas, e início da maturação fisiológica. Enquanto que para uma cultivar (tayhú), não foi registrada a transmissão do referido patógeno pelas sementes, no outro cultivar (tambó) foram registrados índices de 20%, 11,25% e 10%, pelo método de papel-toalha, respectivamente para as três épocas de inoculação das vagens anteriormente mencionadas. Araújo (1988) também encontrou menor ocorrência de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro, colhidas de plantas inoculadas mais tardiamente, enquanto que, sementes colhidas de plantas inoculadas no estágio de formação das vagens

(R7), resultaram em índices de até 32% de ocorrência do referido fungo, obtidos pelo método do papel de filtro.

O conhecimento do estágio de desenvolvimento das plantas, no qual a infecção se traduz em maior transmissão do patógeno para as sementes, e destas para as plântulas, pode ser de grande importância em trabalhos de inspeção sanitária de campos de produção de sementes (Machado, 1988). Entretanto, a utilização destes conhecimentos para a produção de sementes infectadas por fungos, para utilização em estudos posteriores, além de ser um procedimento demorado, é também de eficiência duvidosa, pois de acordo com alguns autores (Neegaard, 1979; Menten, 1988; Machado, 1994), a transmissão de patógenos da planta para a semente constitui um processo dinâmico, dependente de vários fatores inerentes ao patógeno, ao hospedeiro e ao meio ambiente.

Sob a visão da Patologia de Sementes, uma semente encontra-se infectada quando o inóculo do patógeno está presente no interior dos tecidos da mesma, como por exemplo, no tegumento, endosperma ou embrião. Quando o inóculo está apenas aderido à superfície externa da semente, considera-se que a semente encontra-se contaminada (Menten, 1986; Machado, 1988).

O método de imersão das sementes, em suspensão de conídios, foi utilizado por Araújo (1988) para infectar sementes de feijoeiro por diferentes raças de *Colletotrichum lindemuthianum*. O autor constatou através do método do papel de filtro que, as sementes dos diferentes cultivares testados, apresentaram maior suscetibilidade ao referido fungo, quando colhidas e inoculadas no estágio de enchimento de grãos (R8), ao passo que sementes colhidas inoculadas no estágio de maturação fisiológica (R9) apresentaram maior número de reações de resistência. Uma outra forma de inocular sementes de feijoeiro com *Colletotrichum lindemuthianum*, utilizada por Rava e Sartorato (1996), foi a infiltração do inóculo por meio de vácuo, durante 5 minutos. Neste trabalho foram obtidas taxas de 27% de plântulas com sintomas

de antracnose.

Resultados obtidos por Tanaka (1990), em estudos com *Colletotrichum gossypii* e *C. g. var. cephalosporioides* e sementes de algodão, mostram que o aumento do tempo de permanência das sementes em suspensão de conídios, de 30 minutos para 2 horas, proporcionou aumento do grau de infecção e do número de sementes infectadas pelos respectivos fungos.

Outros métodos de inoculação como: mistura de uma formulação em pó de caolim + esporos do fungo (Vieira, 1996), ou massa de micélio + esporos às sementes (Tanaka e Corrêa, 1981), também são relatados na literatura, principalmente para fungos de armazenamento. A vantagem do primeiro método consiste no fato de que as sementes podem ser inoculadas via seca, mantendo a condição inicial de umidade, ao passo que os demais métodos citados envolvem modificações físicas e fisiológicas das sementes, pelo início do processo de embebição das sementes.

Costa (1939) utilizou-se do método da exposição das sementes de algodão à colônias de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, crescidas em meio de cultura, para infectar as sementes pelos referidos fungos. Tanaka, Menten e Mariano (1989), avaliando a metodologia anteriormente mencionada, constataram pelo método do papel de filtro que, a porcentagem de ocorrência de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e o grau de associação deste fungo às sementes inoculadas, foi diretamente proporcional ao tempo de exposição destas às colônias fúngicas em desenvolvimento.

Tanaka (1990) comparou diferentes métodos de inoculação de *Colletotrichum gossypii* e *C. g. var. cephalosporioides* em sementes de algodão. A autora constatou que o método de contato das sementes com as colônias dos fungos em desenvolvimento, proporcionou maior número de sementes infectadas do que o método de imersão destas em suspensão de conídios, mostrando-se mais eficiente para se obter uma associação do tipo infecção.

A inoculação de sementes de feijoeiro, pelo contato destas com colônias de *Sclerotinia sclerotiorum*, por 30 horas de exposição, proporcionou uma eficiência variável de zero a 31% de sementes portadoras do referido fungo, avaliadas pelo método do papel de filtro. Já para sementes de soja, a eficiência do mesmo método, para o mesmo fungo, variou de 35 a 100% (Peres, 1996).

Oliveira (1991) avaliou a transmissibilidade de *Colletotrichum lindemuthianum* por sementes de feijoeiro, da variedade lustroso, inoculadas por diferentes métodos. De acordo com os resultados apresentados, o método de contato das sementes com colônias fúngicas, pelo período de 24 horas, resultou em índices de ocorrência do referido fungo de aproximadamente 64,3%, contra 11,4%, no método de imersão das sementes em suspensão de conídios durante 2 horas, e 2,1% no método de imersão por 30 minutos, avaliados pelo método do papel de filtro ("blotter test"). A transmissibilidade de *Colletotrichum lindemuthianum* pelas sementes inoculadas, avaliada em casa de vegetação aos 15 dias após a semeadura, foi de 5,7%, 2,8% e 1,4%, respectivamente, para os métodos acima citados. Entretanto, a ocorrência de 9,3%, 37,10% e 12,50% de sementes não germinadas, respectivamente, para os mesmos métodos de inoculação anteriormente citados, sugere que a ocorrência de sementes mortas é dependente da forma de embebição das mesmas. Informações específicas a respeito dos efeitos de tais métodos na qualidade fisiológica das sementes, são escassas na literatura.

Vieira (1988) comenta que a técnica de embebição de sementes de soja em suspensão de ascósporos de *Sclerotinia sclerotiorum*, para a avaliação do comportamento de variedades de soja, pode apresentar resultados variáveis, em função da causa e do nível de deterioração das sementes inoculadas. De acordo com Kantar, Hbbenthwaite e Pilbean (1996), fatores como a constituição química e a condição física do tegumento, danos por embebição e taxa de exsudação de solutos, são fatores que podem facilitar a infecção da semente por

ocasião da germinação.

Carvalho (1989), considerando três níveis de qualidade fisiológica de sementes de feijoeiro, concluiu que, a ausência de tegumento e a condição avançada de deterioração das sementes, foram fatores importantes para predisposição destas à ação de patógenos, entre os quais cita-se *Colletotrichum lindemuthianum*.

Silva (1997) verificou que o método de contato das sementes com colônias de *Colletotrichum lindemuthianum*, durante o período de 48 horas, não foi eficiente em evidenciar os efeitos desse patógeno em seus experimentos. Porém, a mesma autora relata que, a exposição das sementes sobre meio de cultura de vagem pelo período de 48 horas, causou um efeito fisiológico positivo na germinação das sementes, após estas terem sido submetidas ao envelhecimento artificial.

2.3 Fundamentos de relações hídricas em um sistema biológico

O estabelecimento do conceito de potencial químico da água permitiu a criação de uma linguagem comum e simples entre cientistas, capaz de expressar o comportamento físico da água no sistema solo - planta - atmosfera. O movimento da água então, tanto no estado líquido como de vapor, pode ser definido por um conceito único, expresso pelo potencial hídrico.

De acordo com este conceito, o potencial hídrico (ψ), expresso em unidades de energia ou pressão, corresponde a diferença entre potencial químico da água em um sistema, ou parte do sistema, e o potencial químico da água pura, nas mesmas condições de pressão atmosférica e temperatura. Ao potencial químico da água pura, atribuiu-se aleatoriamente o valor de zero (Salisbury e Ross, 1991).

As unidades mais usadas para expressar o potencial hídrico são o bar, atmosferas (atm) ($1 \text{ bar} = 10^3 \text{ dinas. cm}^{-2} = 10^{-2} \text{ J. Kg}^{-1} = 0,987 \text{ atm}$) e o

megapascal (MPa) (1MPa = 10 bar) (Bewley e Black, 1994). As principais forças que atuam sobre a água num sistema biológico, podem ser expressas pelo potencial hídrico (ψ) na seguinte expressão (Duniway, 1979; Bewley e Black, 1994):

$$\psi = \psi_s + \psi_m + \psi_p$$

O potencial osmótico (ψ_s) é inversamente proporcional à concentração de solutos na solução, assumindo valores negativos, ou igual a zero, para a água pura (Salisbury e Ross 1991). Assim, o potencial osmótico representa a diminuição do potencial hídrico, em função da concentração de solutos dissolvidos no interior da célula (Hall e MacHardy,1981). O potencial mátrico (ψ_m) resulta da interação entre a água e certas matrizes, como por exemplo, proteínas, polissacarídeos, argilas e paredes celulares (Solisbury e Ross, 1991). O potencial mátrico representa a diminuição do potencial hídrico em função de forças de adsorção e capilaridade (Duniway, 1979). Um colóide seco, ou uma superfície hidrofílica, tais como papel de filtro, madeira, solo ou gelatina, têm um potencial mátrico extremamente negativo (abaixo de -300 MPa), enquanto que o mesmo material saturado com água pura, apresenta potencial mátrico igual a zero (Salisbury e Ross, 1991). Já o potencial de pressão (ψ_p) ocorre quando a célula absorve água, gerando uma pressão interna sobre a parede da célula. O componente de pressão é portanto, uma força oposta, de valor positivo, enquanto os componentes mátrico e osmótico, apresentam valores negativos, mais baixos que o da água pura. A soma dos potenciais osmótico (ψ_s), mátrico (ψ_m) e de pressão (ψ_p), resulta em um valor negativo, exceto em células completamente túrgidas, onde este valor se aproxima de zero (Bewley e Black, 1994).

De acordo com Salisbury e Ross (1991), a tendência natural da água é de fluir naturalmente por difusão, em um gradiente decrescente de potencial hídrico, até que o equilíbrio se estabeleça. Assim, um sistema hídrico em equilíbrio possui o mesmo potencial hídrico em todas as partes do sistema

($\Delta\psi = 0$), mesmo em valores negativos de potencial hídrico.

O potencial hídrico das células vivas em atividade é determinado pelos componentes osmótico e de pressão, pois o componente mátrico é negligenciável (Hall e MacHardy, 1981). Segundo Duniway (1979), as relações hídricas entre células fúngicas, circundadas por uma membrana semi - permeável e uma parede rígida, assemelham-se às relações hídricas internas das células de plantas superiores.

Enquanto o baixo potencial hídrico de sementes secas é atribuído a forças mátricas (Bradford, 1986, Bewley e Black, 1994), o potencial osmótico é o componente mais negativo do potencial hídrico de células fúngicas (Duniway, 1979).

De acordo com Bradford (1986), uma semente seca em equilíbrio higroscópico, com uma atmosfera de 50% de umidade relativa, pode ter um potencial hídrico em torno de -100 MPa. Tal fato propicia uma ampla faixa de gradiente hídrico favorável à absorção de água pela semente, quando esta é colocada em água pura ($\psi = 0$), ou em substratos com potenciais hídricos maiores que - 2,0 MPa.

Da mesma forma, se uma célula microbiana apresenta um potencial hídrico menor que o ambiente que a circunda, a célula absorverá água até que o equilíbrio se estabeleça. O processo inverso também é válido, e se esta condição persistir, resultará em perda de turgor, com posterior dessecação e morte da célula, a não ser que o microrganismo desenvolva mecanismos de osmoregulação ou estruturas de resistência, que confirmam proteção à perda de água (Cook e Papendick, 1978).

O ajustamento osmótico, ou osmoregulação, é o fenômeno pelo qual as células ajustam-se a grandes mudanças no potencial osmótico do ambiente, através de uma regulação das quantidades de solutos osmoticamente compatíveis dentro das células (Salisbury e Ross, 1991). O acúmulo de solutos é encontrado

em bactérias, fungos, plantas e animais, indicando que a maioria, ou todos os organismos, são capazes de ajustes osmóticos, até certo ponto (Thomas, Sepahi, Arendall, et al. 1995).

2.4 Germinação e restrição hídrica em sementes

O processo de germinação é influenciado por uma série de fatores, internos à semente, como a dormência, e externos, como a temperatura e a disponibilidade de água e de oxigênio (Bewley e Black, 1994). É necessário então, que ocorra um conjunto de condições favoráveis para que este processo seja bem sucedido (Popinigis, 1977).

A semente seca, em estado quiescente, é caracterizada por possuir um baixo conteúdo de água e por ser quase inativa metabolicamente (Mayer e Poljakoff - Mayber, 1989). A entrada de água na semente constitui a primeira etapa de uma série de eventos, como ativação enzimática, degradação, translocação e consumo do material de reserva, que culmina com a retomada do crescimento do eixo embrionário (Bewley e Black, 1994).

A velocidade de reidratação da semente depende, entre outros fatores, da espécie, da permeabilidade do tegumento à água, da composição química da semente, da disponibilidade hídrica no estado líquido ou gasoso, da temperatura, da pressão hidrostática (Vertucci e Leopold, 1983; Carvalho e Nakagawa, 1988), do grau de umidade inicial da semente (Hobbs e Obendorf, 1972) e da qualidade fisiológica da semente (Toledo e Marcos Filho, 1977; Carvalho e Nakagawa, 1988). A característica estrutural da semente também é um importante fator pois, certas espécies de leguminosas como *Vicia* e *Phaseolus* sp, absorvem mais água pela micrópila do que pelo resto do tegumento (Bewley e Black, 1994).

A maioria das sementes quando colocadas para germinar, em condições ambientais ideais, apresentam um padrão trifásico de embebição, segundo o modelo apresentado por Bewley e Black (1994). Na fase inicial da embebição

(fase I) ocorre uma rápida absorção de água pelas sementes, decorrente das forças mátricas que atuam nos tecidos das mesmas, independente destas serem viáveis, inviáveis ou dormentes, quando a causa da dormência não for a impermeabilidade do tegumento. Ocorre então, o início da degradação das reservas da semente.

À medida que inicia-se o processo de embebição, as sementes exsudam íons e constituintes orgânicos, o que pode estimular o crescimento de microrganismos e levar a deterioração das mesmas. Neste sentido, o tegumento da semente desempenha uma importante função protetora durante a embebição das sementes, pois este, funciona como uma barreira ao efluxo de solutos, quando estas são embebidas (Bewley e Black, 1994).

Ao atingirem valores de umidade entre 35 e 40%, as sementes cotiledonares iniciam a fase II de embebição (Carvalho e Nakagawa, 1988). O potencial hídrico da semente na fase II é resultante da interação entre o potencial osmótico (ψ_s) e o potencial de pressão (ψ_p) das células metabolicamente ativas, pois nestas, o potencial mátrico (ψ_m) assume valores desprezíveis (Bradford, 1986). Este período é caracterizado pelo transporte ativo das reservas desdobradas e pelo pequeno acréscimo no conteúdo de água das sementes (Bewley e Black, 1994). A fase II pode ser de 8 a 10 vezes mais longa do que a primeira fase de embebição, e quando as sementes cotiledonares atingem valores de umidade entre 50 e 60 %, inicia-se a fase III, alcançada apenas por sementes viáveis e não dormentes (Carvalho e Nakagawa, 1988). Nesta etapa ocorre a retomada da absorção de água pela semente, o alongamento celular e a emergência da radícula, o que indica que a germinação foi completada (Bewley e Black, 1994).

De acordo com Bradford (1986), a emergência da radícula está relacionada à obtenção de um nível mínimo de umidade na semente (faseII), que praticamente estabiliza-se, até o momento exato da emissão da radícula. O grau

de umidade mínimo exigido para a emissão da raiz primária, em sementes de feijoeiro, situa-se na faixa de 48 a 50% (Shioga 1990).

A desidratação das sementes durante as primeiras fases da embebição, não provoca danos irreparáveis ao embrião, porém, a partir da fase III, os danos provocados pela secagem podem ser irreversíveis (Bewley e Black, 1994). Neste aspecto, Senaratna e Mckersie (1983) observaram que a desidratação de sementes de soja à 10% de umidade, após a embebição em substrato de papel umedecido com água destilada, por 36 horas a 25°C, foi letal para as sementes. No entanto, a perda da viabilidade só foi observada para sementes que foram secas a valores de umidade inferiores a 20%, após estas serem embebidas por 12 horas ou mais.

O crescente interesse em tratamentos que envolvem o início das atividades pré - germinativas, levou ao desenvolvimento de vários estudos envolvendo técnicas que permitem controlar a hidratação e a germinação das sementes. Entre estes estudos, destaca-se a técnica do condicionamento osmótico, relatada para sementes de diferentes espécies (Eira, 1988; Guimarães, 1991; Braccini, 1996), também referida como "priming" (Heydecker, Higging e Turner, 1975), condicionamento fisiológico (Marcos Filho, 1986; Doni Filho, 1992; Vazquez, 1995), entre outras denominações.

A técnica do condicionamento osmótico consiste em colocar as sementes em contato com um substrato, com o potencial hídrico ajustado para que a semente absorva água até um nível, em que, todos os processos preparatórios à germinação ocorram, sem contudo, atingir a fase de alongamento celular e, conseqüentemente, a emissão da radícula (Heydecker, Higging e Turner, 1975; Bradford, 1986).

Vários produtos já foram utilizados para o ajuste do potencial hídrico de substratos em estudos envolvendo o condicionamento osmótico de sementes de diferentes espécies. Entre estes, cita-se sais como $MgSO_4$, $NaCl$, $MgCl_2$, K_3PO_4 ,

KH_2PO_4 , glicerol, manitol e polietileno glicol (Pill, 1994).

O potencial hídrico de uma solução é designado de osmótico (ψ_s), e refere-se ao nível de energia da água em solução. Para soluções verdadeiras, como por exemplo, de sais e manitol, o potencial osmótico da solução pode ser calculado pela fórmula de Van't Hoff (Salisbury e Ross, 1991). Entretanto, de acordo com Steuter, Mozafar e Goodin (1981), as forças matriciais são os principais componentes do potencial hídrico de meios de polietileno glicol. Uma equação empírica foi deduzida para calcular as relações entre temperaturas, potenciais hídricos, e concentrações de PEG 6.000 (Michel e Kaufmann, 1973), e de PEG 8.000 (Michel, 1983). De acordo com os mesmos autores acima citados, há efeito sinérgico no potencial hídrico de preparações de polietileno glicol na presença de outros solutos. Assim, o potencial hídrico de preparações de polietileno glicol em mistura com outros solutos, sais e manitol por exemplo, são mais negativos do que a soma dos valores individuais de cada soluto (Michel e Kaufmann 1983; Michel, 1983).

Sais e manitol têm sido extensivamente utilizados como solutos osmóticos, mas ambos podem ser absorvidos pelas sementes, resultando em alteração do gradiente de potencial hídrico, e efeitos tóxicos em alguns casos. Conseqüentemente, por ser de alto peso molecular, o polietileno glicol (PEG 6.000 – 8.000) tem sido extensivamente utilizado para controlar o potencial hídrico do meio externo em estudos envolvendo a germinação de sementes (Bradford, 1995).

Prisco e Oleary (1970) mostraram que o polietileno glicol (Carbowax 1540) foi mais efetivo em inibir a emissão de radícula de sementes de feijoeiro do que soluções de NaCl, que por sua vez, causou efeitos tóxicos. Del Giúdice (1996) evidenciou em seus estudos que, o uso de soluções de polietileno glicol (PEG 6.000), foi mais efetivo em inibir a emissão de radículas de sementes de soja do que soluções de manitol, em potenciais osmóticos

similares. O mesmo autor observou ainda, uma alta incidência de sementes infectadas por microrganismos nos tratamentos com manitol, especialmente em potenciais osmóticos mais negativos, e a partir do quarto dia de pré - condicionamento das sementes.

De acordo com Bradford (1986), a emergência da radícula ocorre quando o conteúdo de água da semente atinge um platô, que depende de um potencial hídrico de equilíbrio específico, entre a semente e o meio externo. Em um experimento com sementes de alface, o autor relata que, a emergência da radícula ocorreu eventualmente em similar conteúdo de água (aproximadamente a 90% de umidade, com base no peso seco) a -0,5 ou -1 MPa . Observou ainda, que a variação no “período lag” a diferentes potenciais hídricos, representa o tempo necessário para gerar solutos o suficiente, para reduzir o potencial osmótico da semente até o nível necessário, para que esta atinja 90% de umidade.

As condições favoráveis ao condicionamento osmótico variam amplamente em função das características das sementes de cada espécie e cultivar, e possivelmente, entre lotes de um mesmo cultivar, em função dos processos fisiológicos e bioquímicos envolvidos (Heydecker, Higging e Turner, 1975; Bradford, 1986).

2.5 Crescimento de fungos em condições de estresse hídrico

Doenças causadas por *Macrophomina phaseoli*, e algumas espécies de *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus* são favorecidas em condições de solo seco, enquanto doenças causadas por *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum* são favorecidas em condições úmidas. Já espécies como *Pythium* e *Phytophthora* são favorecidas em condições de solo encharcado (Cook e Papendick, 1972).

Interesses específicos de alguns pesquisadores têm levado ao

desenvolvimento de trabalhos que relacionam respostas fúngicas ao estresse hídrico induzido em diferentes substratos (Adebayo e Harris, 1971; Cook e Papedick, 1972; Mexal e Reid, 1973; Cooke e Papedick, 1978; Moley, Williams e Price 1993; Gao e Shain, 1995; Alam, Joyce e Wearyng 1996).

O ajuste do potencial hídrico de substratos agarizados, em relação ao desenvolvimento de microrganismos, normalmente, é feito pela adição de solutos osmoticamente ativos, como CaCl_2 (Alam, Joyce e Wearyng 1996), KCl , sacarose ou mistura de sais (NaCl , KCl , $\text{Na}_2\text{SO}_4 = 5 : 3 : 2$) (Ioannou, Schneider e Grogan, 1977; Wearing e Burgess, 1979; Morley, Williams e Price, 1993; Gao e Shain 1995; Alam, Joyce e Wearyng, 1996), ou pela adição de polietileno glicol (Mexal e Reid, 1973; Ioannou, Schneider e Grogan, 1977; Brownell e Schneider, 1985; Alam, Joyce e Wearyng, 1996), mais utilizado em meios líquidos, pois o ágar não solidifica-se em altas concentrações de polietileno glicol, como verificado por Brownell e Schneider (1985).

Alam, Joyce e Wearyng (1996) observaram que o diâmetro médio de colônias de *Botrytis cinerea* e *Alternaria alternata*, crescidas em meio de cultura modificado pela adição dos vários solutos osmóticos, foi estimulado na faixa de -0,36 MPa à -1 MPa, ao passo que em valores mais negativos, o diâmetro das colônias decresceu progressivamente. Crescimento do diâmetro médio de colônias entre zero e -2 MPa, e posterior queda com a diminuição do potencial osmótico, também foram descritos para outros fungos como *Phytophthora cinnamomi*, *Alternaria tenuis*, *Fusarium roseum* "graminearum," *Ascochyta paspali*, *Aspergillus niger*, *Fusarium moliniforme*, *Cryphonectria parasitica*, *Botrytis cinerea* e *Alternaria alternata* (Adebayo e Harris, 1971; Wearing e Burgess, 1979; Morley, Williams e Price, 1993; Subbarão, Michailides e Morgan, 1993; Gao e Shaim, 1995; Alam, Joyce e Wearyng, 1996).

De acordo com Alam, Joyce e Wearyng (1996), o efeito estimulador no crescimento de colônias de *B. cinerea* e de *A. alternata*, em potenciais

osmóticos entre -0,36 a -1,0 MPa, foi devido à absorção de solutos, e a um melhor ajuste osmótico das células fúngicas, proporcionando maior turgor para a extensão celular. Já o declínio no diâmetro médio, das colônias encontradas para os vários solutos, à medida que o potencial osmótico foi diminuindo, evidencia os efeitos diretos do potencial osmótico no crescimento dos fungos.

O crescimento de colônias de *P. cinnamomi* e *A. tenuis* foi inibido na faixa de potenciais osmóticos de -40 bar (-4 MPa) a -50 bar (-5 MPa), e de -130 bar (-13 MPa) a -140 bar (-14 MPa), respectivamente (Adebayo e Harris, 1971). Morley, Williams e Price (1993) relataram que o crescimento de colônias de *A. paspali* decresceu a partir do potencial osmótico de -1,2 MPa, e foi inibido a -4,5 MPa. Já o crescimento de colônias de *C. parasitica* foi inibido em potenciais osmóticos de -9 MPa, para todas as seis raças do fungo estudadas (Gao e Shaim, 1995).

Inibição completa do crescimento de colônias de *B. cinerea* e *A. alternata* foi constatada por Alam, Joyce e Wearyng (1996), a -8 MPa, em meios corrigidos com CaCl_2 . Este efeito foi atribuído ao íon de Cálcio (Ca^{2+}), não observado para os demais solutos, utilizados no ajuste da restrição hídrica do substrato. Gao e Shaim (1995) salientaram que o crescimento reduzido de *C. parasitica*, em meios que contém sódio, sugere um efeito tóxico deste íon, quando comparado com meios que contém outros solutos osmóticos.

Os efeitos combinados da permeabilidade seletiva da membrana, e da compatibilidade ou toxidez de solutos, tanto internamente quanto externamente à membrana celular, provavelmente respondem, em grande parte, ao crescimento diferenciado de fungos aos vários solutos osmóticos (Duniway, 1979).

O uso de sacarose para ajustar o potencial osmótico do meio de cultura, proporcionou um efeito estimulador no diâmetro médio de colônias de *C. parasitica* (Gao e Shain, 1995), de *B. cinerea* e *A. alternata* (Alam, Joyce e Wearyng, 1996), quando comparado com a utilização de sais ou mistura de sais

em potenciais hídricos similares. Gao e Shain (1995) atribuíram esta diferença à fonte adicional de carbono fornecida pelo açúcar.

De acordo com Duniway (1979), o suprimento energético é um importante parâmetro para o crescimento de fungos em baixos potenciais osmóticos. Wearing e Burgess (1979) constataram que os limites absolutos de potencial hídrico para o crescimento de *F. roseum* "Graminearum" são influenciados pela temperatura, nutrientes e pelo tempo de incubação, como também observado, posteriormente, por Subbarão, Michailides e Morgan (1993) para *F. moliniforme*. As exigências para o crescimento de cada microrganismo, em relação ao potencial hídrico do substrato, pode variar com o pH, temperatura, entre outros fatores, e quanto mais favorável a nutrição e o ambiente, mais baixo é o potencial hídrico no qual os microrganismos podem crescer (Cook e Papendick, 1978).

Mexal e Reid (1973) comentam que o polietileno glicol (PEG - 4000) é um soluto apropriado para induzir o estresse hídrico em fungos, pois, embora possa ser absorvido em menor extensão, não é metabolizado como açúcares, e não é tóxico em altas concentrações, como os sais podem ser.

Outro fato observado por Alam, Joyce e Wearyng (1960) é que a cor das colônias de *A. alternata* foi influenciada pelos vários solutos osmóticos, enquanto que o mesmo não ocorreu para *B. cinerea*. Em meios corrigidos por sacarose, colônias de *A. alternata* eram quase brancas, ao passo que em meio corrigido por CaCl_2 , as colônias apresentavam coloração marrom-escura, enquanto que em meios corrigidos por KCl ou mistura de sais, era castanho-claras.

De acordo com Morley, Williams e Price (1993), a coloração de colônias de *A. paspali* não foi afetada pelos diferentes sais, porém, variou com o potencial hídrico, apresentando coloração marrom-escura a $-0,25$ MPa, adquirindo tonalidades rosa à medida que o potencial hídrico foi decrescendo, tornando-se rosa a $-2,8$ MPa.

Cook e Papendick (1978) comentam que o potencial hídrico pode diminuir a velocidade ou parar a patogênese, fato este, também observado por Alam, Joyce e Wearyng (1996) para *B. cinerea* e *A. alternata* em baixos potenciais hídricos, pela redução ou supressão do crescimento micelial dos fungos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura, e no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras - MG, no período de fevereiro a julho de 1998. Este estudo foi dividido em três etapas: na primeira foi avaliada a eficiência da restrição hídrica do substrato agarizado em inibir a emissão de radículas de sementes de feijoeiro; na segunda foi avaliado o crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum* em função da restrição hídrica do substrato agarizado; e na terceira etapa foi avaliado o uso da restrição hídrica do substrato agarizado na obtenção de sementes de feijoeiro infectadas por *C. lindemuthianum*.

3.1 Origem e caracterização das sementes utilizadas

As sementes utilizadas foram obtidas de lavoura comercial de feijão cultivar carioca, safra 1997/98, no município de Cana Verde – MG. As sementes foram colhidas, debulhadas manualmente, e classificadas em peneiras de crivos oblongos; foram utilizadas aquelas que ficaram retidas em peneira 12 x $\frac{3}{4}$. Posteriormente, foi efetuada uma seleção manual, em que as sementes quebradas, enrugadas, com trincas no tegumento, manchadas, descoloridas, e as que não obedeciam o padrão da cultivar em estudo, foram descartadas. Após homogeneizadas manualmente, as sementes foram armazenadas em câmara fria e seca (10°C e 50% UR), até a realização do experimento. De acordo com testes padrões, recomendados e descritos nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992) e International Seed Testing Association (ISTA, 1976), as sementes utilizadas apresentavam as características indicadas na tabela 1.

Tabela 1. Caracterização da qualidade inicial das sementes de feijão.
UFLA - Lavras - MG - 1999.

Parâmetros	Valores médios
Germinação (%)	100,00
Potencial de vigor (%)	100,00
Potencial de viabilidade (%)	100,00
Grau de umidade (%)	12,30
Peso de cem sementes (g)	26,05
Sanidade:	
• Papel de filtro (%)	
<i>Aspergillus flavus</i>	3,50
<i>Aspergillus glaucus</i>	2,00
<i>Aspergillus ochraceus</i>	8,00
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	52,00
<i>Fusarium</i> sp	29,00
<i>Penicillium</i> sp	1,75
• Rolo de papel (%)	
Incidência de plântulas infectadas	0

3.2 Obtenção e multiplicação do inóculo

As culturas puras iniciais de *C. lindemuthianum*, foram obtidas da micoteca do Setor de Resistência de Plantas e Doenças do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras - M.G. Foi utilizado o isolado 1001, identificado como pertencente à raça 89 de *C. lindemuthianum* patógeno, pelo sistema binário proposto por Habgood (1970), e pelas plantas diferenciadoras recomendadas pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). A multiplicação do inóculo foi realizada, inicialmente, através da repicagem de fragmentos de micélio de tubos da micoteca para placas de Pétri, de vidro, de 9 cm de diâmetro, contendo M3 (Junqueira, Chaves, Zambolin et al., 1984). A partir das colônias desenvolvidas, após 7 dias de incubação em BOD, à temperatura de 20°C e fotoperíodo alternado de 12 horas, foi efetuada a repicagem definitiva do inóculo, constituído de suspensão de conídios, para os

mesmos tipos de placas, contendo o mesmo substrato e submetidas às mesmas condições de incubação já referidas.

3.3 Preparo do meio de cultura básico e restrição hídrica

O meio de cultura básico utilizado foi o BDA (extrato de 400g de batatas, 40g de dextrose e 40g de ágar), pH 5,8. Para a obtenção dos tratamentos de restrição hídrica do referido meio, foram utilizadas preparações de polietileno glicol (PEG 6.000) em água, e soluções de manitol (peso molecular 182,17g). Para efeito de cálculos, foram consideradas, inicialmente, a temperatura de 20°C, e os potenciais hídricos de -0,4, -0,6, -0,8 e -1 (MPa). As concentrações necessárias para a obtenção das preparações de polietileno glicol, em cada potencial hídrico acima mencionado, foram obtidas através da equação de Michel e Kaufmann (1973):

$$\psi = - (1,18 \times 10^{-2})C - (1,18 \times 10^{-4})C^2 + (2,67 \times 10^{-4})C T + (8,39 \times 10^{-7})C^2 T ,$$

onde:

ψ = Potencial osmótico (bars)

C = Concentração (g de PEG / kg de água)

T = Temperatura (°C)

As concentrações necessárias para a obtenção das soluções de manitol, nos mesmos potenciais hídricos e temperatura, acima citados, foram obtidas pela fórmula de Van't Hoff (Salisbury e Ross, 1991):

$$P_o = - C i R T ,$$

onde:

P_o = Potencial osmótico (MPa)

i = Constante de ionização

R = Constante geral dos gases ($0,00831 \times \text{Kg} \times \text{MPa} \times \text{mol}^{-1} \times \text{K}^{-1}$)

T = Temperatura absoluta (°C + 273)

C = Concentração (moles / Kg de água)

Os valores das concentrações ("C"), calculadas para cada potencial hídrico e soluto, como acima descrito, foram utilizados em dobro (Tabela 2).

Tabela 2. Concentrações das preparações de PEG 6.000 e de manitol, utilizadas para a obtenção dos níveis de restrições hídricas do meio de cultura básico. UFLA - Lavras - MG - 1999.

Soluto	Restrição hídrica do meio de cultura básico (MPa)			
	-0,4	-0,6	-0,8	-1,0
PEG 6.000	338 *	427	502	568
Manitol	60 *	90	120	150

* Gramas do soluto por quilo de água

Em condições assépticas, um volume da preparação de cada nível de restrição hídrica e soluto, como acima descrito, foi diluído a um mesmo volume de meio de cultura básico fundente, obtendo-se o dobro do volume de meio de cultura (BDA + PEG 6.000 e BDA + manitol) nas restrições hídricas calculadas inicialmente (-0,4, -0,6, -0,8 e -1 MPa). Considerando que o tratamento testemunha (BDA) foi constituído pela adição de um volume de água destilada, ao mesmo volume de meio de cultura básico fundente, as possíveis interações entre o potencial hídrico inicial do BDA, e o potencial hídrico das preparações de PEG 6.000 ou de manitol, foram desconsideradas.

3.4 Primeira etapa: Pré-condicionamento de sementes de feijoeiro em relação à restrição hídrica do substrato agarizado

*Univer
de 1968*

3.4.1 Tratamentos e instalação do ensaio

Os tratamentos consistiram em expor, por diferentes períodos de tempos, sementes de feijoeiro, desinfestadas e não desinfestadas, sobre 9 tipos de substratos, constituídos por 4 níveis de restrição hídrica do BDA (-0,4, -0,6, -0,8 e -1 (MPa)), pelo uso de 2 diferentes solutos (BDA + PEG 6.000 e BDA + manitol), e 1 tratamento em BDA (ausência de PEG 6.000 e de manitol) como testemunha, totalizando 18 tratamentos. O tratamento de assepsia superficial das sementes, consistiu em imergir estas em solução de hipoclorito de sódio a 1% durante 1 minuto e, posteriormente, lavar 3 vezes em água destilada esterilizada. Foram utilizadas 4 placas de pétri de vidro, de 15 cm de diâmetro, para cada tratamento. Cada placa, contendo 40 ml de substrato e 25 sementes equidistantes entre si, foi considerada uma parcela experimental. As parcelas foram distribuídas ao acaso em uma incubadora do tipo BOD, onde permaneceram por 168 horas à temperatura de 20°C e escuro contínuo. As sementes dos tratamentos, nos quais não houve emissão de radículas, após as 168 horas de pré - condicionamento, foram lavadas 3 vezes em água destilada e secas ao ar, pelo período de 3 dias; em seguida, foram submetidas ao teste de germinação no sistema de rolos de papel-toalha, umedecidos com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco, em 4 repetições de 25 sementes, e a temperatura de 25°C.

3.4.2 Avaliações

Foram feitas dois tipos de avaliações: a primeira consistiu em anotar o número total de sementes germinadas em cada placa após 24, 48, 72, 96, 144 e 168 horas de pré-condicionamento das sementes, considerando como

germinadas as sementes com sinais visíveis de emissão da radícula (comprimento $\geq 0,1\text{cm}$); a segunda consistiu em avaliar, aos 5 dias após a semeadura, o número de plântulas normais e de sementes mortas, seguindo os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Os resultados de ambas as avaliações foram expressos em porcentagem.

3.4.3 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, e os tratamentos referentes à emissão de radículas consistiram de 1 tratamento testemunha em BDA (ausência de PEG 6.000 e manitol), e um arranjo fatorial, com 1 fator quantitativo (restrição hídrica) em 4 níveis (-0,4, -0,6, -0,8 e -1(MPa)) e 2 fatores qualitativos que foram: o tipo de substrato (BDA + PEG 6.000 e BDA + manitol) e o tratamento de assepsia superficial (sementes desinfestadas e não desinfestadas). A variável resposta refere-se à proporção de emissão de radículas de sementes de feijoeiro, acumulada em diferentes períodos de tempo de exposição das mesmas (o tempo de exposição das sementes foi considerado como variável regressora). Os resíduos seguem uma distribuição binomial, ajustado a um modelo linear generalizado com a função ligadora canônica logit. A análise de “deviância”, testes de razão de verossimilhanças para as fontes de variação controladas no modelo, conforme Nelder e Wedderburn, (1972), foi realizada de forma seqüencial (tipo 1), e a proporção (variável resposta) foi estimada como segue: $p = [\exp(n_{ij}) / 1 + \exp(n_{ij})]$, em que n_i é o melhor preditor linear ajustado. O ajuste foi realizado com o auxílio da “PROC GENMOD do SAS (SAS Institute Inc., 1992). O delineamento utilizado para os tratamentos referentes à germinação das sementes secas, após o período de 168 horas de exposição das mesmas aos diferentes substratos, foi o inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial entre 2 modalidades de pré-tratamento de assepsia das sementes

(desinfestadas e não desinfestadas) e 2 tipos de substratos à restrição hídrica de -1 MPa (BDA + PEG 6.000 e BDA + manitol), e 2 tratamentos adicionais à restrição hídrica de -0,8 MPa (sementes desinfestadas e não desinfestadas). Os dados referentes à porcentagem de sementes mortas foram transformados em $\sqrt{X + 0,5}$, e as análises de variância dos dados, realizadas com o auxílio da PROC GLM do SAS, acima citado.

3.5 Segunda etapa: Crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum* em relação à restrição hídrica do substrato agarizado

3.5.1 Tratamentos e instalação do ensaio

Os tratamentos foram constituídos por 4 níveis de restrição hídrica do BDA (-0,4, -0,6, -0,8 e -1 (MPa)), pelo uso de dois diferentes solutos (BDA + PEG 6.000 e BDA + manitol), e 1 tratamento em BDA (ausência de PEG 6.000 e de manitol) como testemunha, totalizando 9 tratamentos. Foram utilizadas 5 placas de Pétri de vidro, de 9 cm de diâmetro por tratamento, contendo 20 ml de substrato, cada placa. A parcela experimental foi constituída por 1 placa, contendo ao centro do substrato um disco de ágar, de 4 mm de diâmetro do inóculo de *Colletotrichum lindemuthianum*, obtido como descrito no item 3.2. Em seguida, as placas foram distribuídas ao acaso em uma incubadora tipo BOD, regulada à temperatura de 20°C e fotoperíodo alternado de 12 horas, onde permaneceram por oito dias.

3.5.2 Avaliações

As avaliações foram efetuadas tomando-se a medida de dois diâmetros ortogonais das colônias de *Colletotrichum lindemuthianum* em desenvolvimento, ao final do oitavo dia de incubação das mesmas. Os resultados foram expressos em diâmetro médio de colônias (mm). Foram descritos a coloração e o aspecto

geral de crescimento das colônias.

3.5.3 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado e os tratamentos seguiram o arranjo fatorial com 1 fator quantitativo (restrição hídrica), em 4 níveis (-0,4, -0,6, -0,8, -1 (MPa)), 1 fator qualitativo pelo uso de 2 tipos de solutos (PEG-6.000 ou manitol), e 1 tratamento adicional como testemunha (BDA), totalizando 9 tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância e de regressão, utilizando a PROC REG do SAS (SAS Institute Inc., 1992).

3.6 Terceira etapa: Uso da restrição hídrica no processo de inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro

3.6.1 Tratamentos e instalação do ensaio

Os tratamentos desta etapa foram definidos com base nos resultados das etapas anteriores. Foram estabelecidos portanto como tratamentos: 4 períodos de exposição das sementes em BDA + manitol (30, 72, 120, 168 horas), e de 1 período em BDA (30 horas) como testemunha, em 2 modalidades de exposição das sementes (inoculação e controle) e um tratamento adicional constituído pelas sementes não embebidas. Foram utilizadas 168 placas de pétri de vidro, de 15cm de diâmetro, para o substrato BDA + manitol (restrição hídrica de -1 MPa), e 42 placas para o substrato BDA (testemunha). Após verter 40 ml de substrato em cada placa, metade das mesmas contendo cada tipo de substrato, receberam 0,2 ml de uma suspensão de conídios do isolado 1001 de *Colletotrichum lindemuthianum*, preparada como descrito no item 3.2., com a concentração de $2,0 \times 10^6$ conídios / ml. Com auxílio de uma alça de Drigalski, o inóculo foi distribuído por toda a superfície do substrato. Em seguida, as placas (inoculadas

e não inoculadas) foram vedadas com parafilme transparente e distribuídas ao acaso em duas incubadoras do tipo BOD, onde permaneceram por 5 dias, no escuro, à temperatura de 20°C. Após este período, em condições assépticas, 30 gramas de sementes foram distribuídas em cada placa. A área de contato das sementes com o substrato também foi padronizada, de maneira que somente um dos cotilédones ficasse em contato com o substrato. A unidade experimental foi constituída por 7 placas de Pétri, totalizando 21 placas por tratamento. Vencidos os períodos de exposição, foram coletadas amostras de sementes, para determinação do grau de umidade (G.U.1). Após este procedimento, as sementes de cada repetição e tratamento, foram reunidas em uma cuba de vidro e lavadas três vezes em água destilada. Em seguida, estas foram acondicionadas em bandejas plásticas, contendo 2 folhas de papel de filtro, e secas ao ar, à temperatura de 20°C ± 2°C, e umidade relativa entre 60 e 80%, durante período de 3 dias. Findo este período, foi determinado o grau de umidade das sementes (G.U.2). As sementes secas, de cada repetição e tratamento, foram amostradas ao acaso para a avaliação dos efeitos dos tratamentos.

3.6.2 Avaliações

Para avaliar o efeito dos tratamentos de incubação (inoculação e controle), foram efetuadas as seguintes determinações:

3.6.2.1 Grau de umidade

Para a determinação do grau de umidade atingido pelas sementes, imediatamente após os períodos de exposição das mesmas (G.U.1), foram amostradas, aleatoriamente, em quatro placas de cada repetição, 4 subamostras de aproximadamente 6g de sementes (peso úmido), totalizando 24g de sementes / repetição / tratamento. Para a determinação do grau de umidade das sementes, após a secagem (G.U.2), foram coletadas amostras de 15 g de

sementes (peso úmido) em cada repetição. O método utilizado foi o da estufa, à $105 \pm 3^\circ\text{C}$, como prescrito pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

3.6.2.2 Sanidade e localização do inóculo

Foram utilizadas 3 repetições de 100 sementes com o tegumento, e 3 repetições de 100 sementes sem o tegumento, por tratamento. Para a remoção do tegumento, as sementes foram tratadas em solução de hipoclorito de sódio a 1%, durante um minuto e, posteriormente, transferidas para caixas do tipo “gerbox,” contendo duas folhas de papel de filtro, saturadas com água destilada esterilizada, onde permaneceram por 14 horas à temperatura de $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. A remoção do tegumento foi realizada sob condições assépticas. As sementes íntegras e sem o tegumento foram assepticamente acondicionadas em substrato de papel-toalha, no sistema de rolos, contendo 25 sementes cada um, utilizando-se duas folhas inferiores e uma superior, previamente umedecidas com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco. Após a montagem dos rolos, estes foram levados para um germinador, à temperatura de $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ e escuro contínuo, onde permaneceram por oito dias. A avaliação foi efetuada observando-se, o número de plântulas infectadas por *Colletotrichum lindemuthianum* (incidência), e a severidade dos sintomas de antracnose, utilizando-se para tanto, uma escala de notas que variou de zero a cinco, em que:

0 = plântulas isentas de qualquer infecção;

1 = plântulas normais, apresentando pequenas pontuações de coloração escura, levemente deprimidas, ocupando menos de 5% da área de um dos cotilédones;

2 = plântulas normais, apresentando lesões de coloração escura, geralmente deprimidas ao centro e com bordos mais claros, ocupando entre 5% e 20% da área de um dos cotilédones;

3 = plântulas normais, apresentando lesões de coloração escura, deprimidas ou não, ocupando entre 20% e 50% da área de um dos cotilédones;

4 = plântulas normais, com mais de 50% de um dos cotilédones atingido por lesões de coloração escura;

5 = plântulas anormais, comprometidas por lesões escuras, geralmente atingindo o ponto de inserção e ocupando mais de 50% de um ou ambos cotilédones, danificando a plúmula, a raiz primária, o colo, ou a haste, com tendência ao colapso da plântula. As sementes não germinadas, com lesões características de antracnose, nos cotilédones, também foram classificadas nesta categoria. De posse da frequência de cada categoria, em cada tratamento, foi efetuado o cálculo do índice de doença pela fórmula proposta por McKinney (1923):

$$ID = \frac{\sum(f.v)}{n.x} . 100, \text{ em que:}$$

ID = índice de doença

f = frequência de plantas em cada grau da escala

v = grau da escala observado

n = número total de plântulas avaliadas

x = nota máxima

Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas infectadas por *Colletotrichum lindemuthianum* e de severidade dos sintomas de antracnose.

3.6.2.3 Germinação das sementes e transmissibilidade de *Colletotrichum lindemuthianum* em condições de laboratório

O ensaio foi conduzido com 3 repetições de 100 sementes, sendo estas acondicionadas em substrato de papel-toalha, no sistema de rolos, contendo 25 sementes cada um, utilizando-se de duas folhas inferiores e uma superior,

previamente umedecidas com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco. As sementes, assim acondicionadas, foram levadas para um germinador, previamente regulado à temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, onde permaneceram por 5 dias. As avaliações consistiram em observar o número de plântulas normais, como prescrito pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil,1992), e os parâmetros de incidência de plântulas enfermas e severidade dos sintomas de antracnose, como relatado anteriormente para os testes de sanidade das sementes. Os resultados foram expressos em porcentagem.

3.6.2.4 Emergência de plântulas em solo / areia e transmissibilidade de *Colletotrichum lindemuthianum* pelas sementes

Para este ensaio, foram utilizadas 3 bandejas plásticas (47 x 27 x 08 cm) por tratamento, contendo cada uma, 4 litros de substrato solo/areia (1 parte de solo / 2 partes de areia), previamente tratado com brometo de metila. Foram semeadas 75 sementes por bandeja (cinco fileiras de quinze sementes), a aproximadamente 1,5 cm de profundidade, constituindo cada bandeja, uma parcela experimental. Após a semeadura, as bandejas foram distribuídas em blocos casualizados em uma sala de crescimento vegetal, com temperatura controlada à $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por um aparelho de ar-condicionado tipo quente / frio, e fotoperíodo alternado de 12 horas. As avaliações consistiram em anotar o número de plântulas emergidas aos 12 dias após o plantio, e a incidência e a severidade dos sintomas de antracnose nas plântulas emergidas, utilizando os mesmos critérios descritos para os testes de sanidade, mencionados anteriormente.

3.6.3 Análise estatística

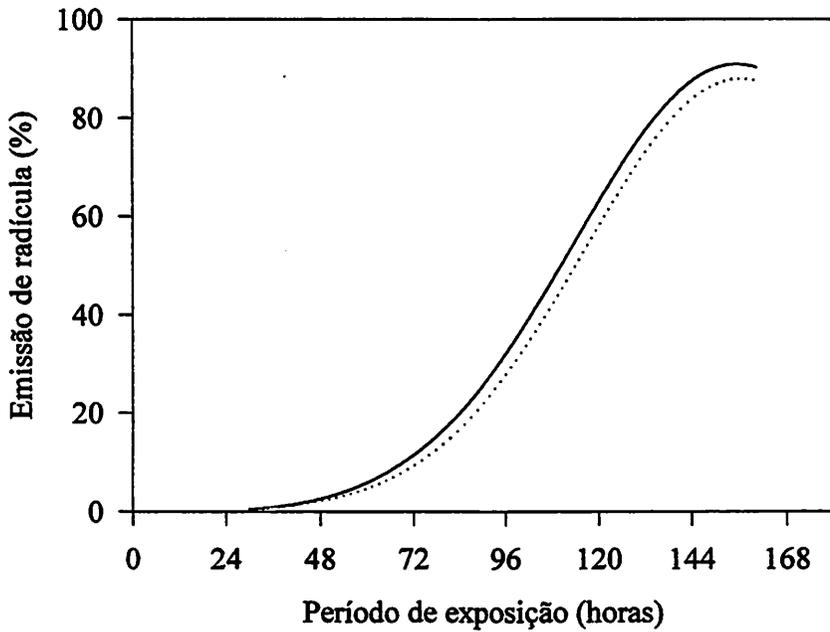
O delineamento experimental, utilizado nas avaliações do grau de umidade, da germinação em laboratório, e da sanidade das sementes, foi o

inteiramente casualizado, em esquema fatorial entre 4 tempos de exposição das sementes em BDA + manitol (30, 72, 120 e 168 horas), em 2 modalidades (inoculação e controle), e 3 tratamentos adicionais, constituídos pelas sementes não embebidas, e pelas sementes expostas ao BDA por 30 horas (testemunha), em 2 modalidades (inoculação e controle). Para a emergência em solo/areia foi utilizado o mesmo arranjo de tratamentos, porém, o delineamento utilizado foi o de blocos casualizados. As análises de variância foram efetuadas com o auxílio da PROC GLM do SAS (SAS Institute Inc. 1992), sendo ajustado um modelo de regressão às médias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Primeira etapa: Pré-condicionamento de sementes de feijoeiro em relação à restrição hídrica do substrato agarizado

Os efeitos do tipo de substrato (BDA + PEG 6.000, BDA + manitol e BDA-testemunha), ($P > 0,0001$), da restrição hídrica ($P > 0,0001$), e do tempo de incubação das sementes ($P > 0,0001$), influenciaram significativamente a emissão de radícula de sementes de feijoeiro, à exceção do pré-tratamento de assepsia das sementes ($P > 0,0810$), em que “P” é a probabilidade de que ocorra erro do tipo I. Pode ser observado também, que houve efeito significativo das interações entre a restrição hídrica e o tipo de substrato ($P > 0,0001$), e do tipo de substrato e o período de incubação das sementes ($P > 0,0041$), (Tabela 1A). As estimativas dos parâmetros lineares, utilizados no modelo de regressão, da emissão de radículas de sementes de feijoeiro, acumulada em função da restrição hídrica, do pré-tratamento de assepsia e do tempo de exposição das sementes aos diferentes substratos, são apresentadas na Tabela 2A. O modelo ajustado foi altamente significativo para todos os parâmetros considerados, a exceção da interação entre o período de exposição das sementes e o substrato BDA + manitol ($P > 0,6549$), ajustando-se bem aos dados nos níveis dos fatores estudados. O início da emissão de radículas pelas sementes, nos tratamentos em BDA (ausência de PEG e de manitol), ocorreu após 48 horas de exposição das sementes atingindo taxas entre 4% e 6 % após 72 horas, 31% e 37% após 96 horas, 83% e 86% após 144 horas, e entre 84% e 88% após 168 horas, para sementes não desinfestadas e desinfestadas, respectivamente. Provavelmente, a tendência de maior porcentagem de emissão de radículas, observada nos tratamentos em que as sementes foram desinfestadas, se deveu ao fato deste tipo de tratamento ter favorecido a absorção de água pelas sementes (Figura 1).

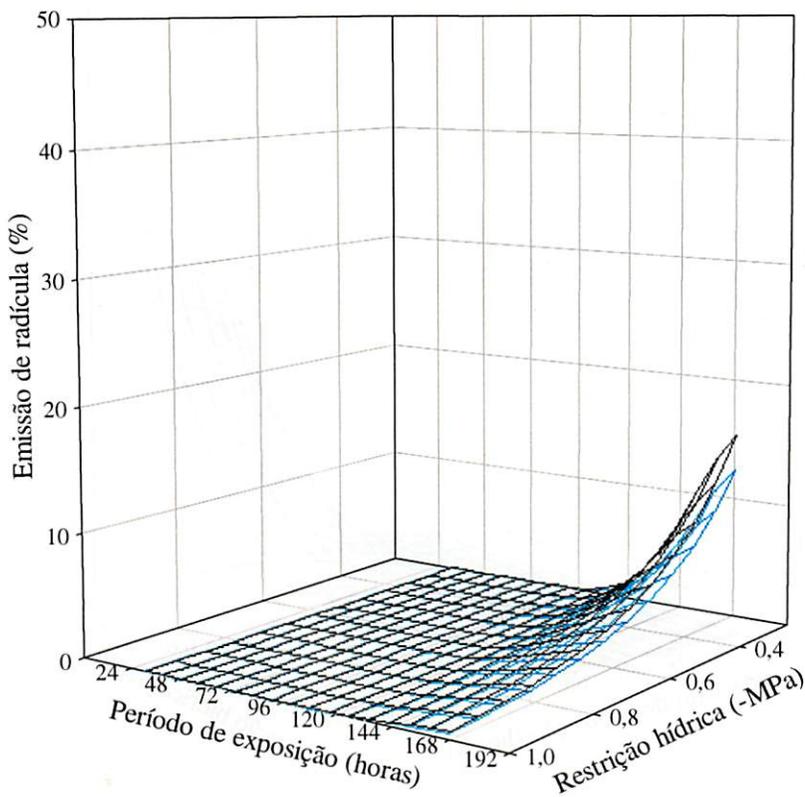


— Desinfestada $n = -13,5432 + 0,1933.x - 0,0006.x^2$
 Não desinfestada $n = -13,8265 + 0,1933.x - 0,0006.x^2$

Figura 1 - Estimativa da porcentagem acumulada de emissão de radículas de sementes de feijoeiro (P), em função do tempo de exposição (x) destas ao substrato BDA (testemunha) para sementes desinfestadas e não desinfestadas em que $P = (e^n / 1 + e^n) \times 100$. UFLA, Lavras - MG, 1999.

A porcentagem acumulada de emissão de radículas de sementes de feijoeiro, em função do período de exposição destas ao BDA (ausência de PEG 6.000 e manitol), concorda com observações feitas por Bradford (1995), em que sementes individuais necessitam de diferentes tempos de embebição para emissão de radículas. Pode ser percebido que, a maioria das sementes germinaram entre o período de 72 e 120 horas de exposição das mesmas, com poucas sementes germinadas antes e após este intervalo de tempo. Já o tempo mínimo necessário para que ocorra a emissão de radículas de sementes de feijoeiro, expostas ao BDA (testemunha), à temperatura de 20 °C e escuro contínuo, foi estimado entre 56 e 59 horas.

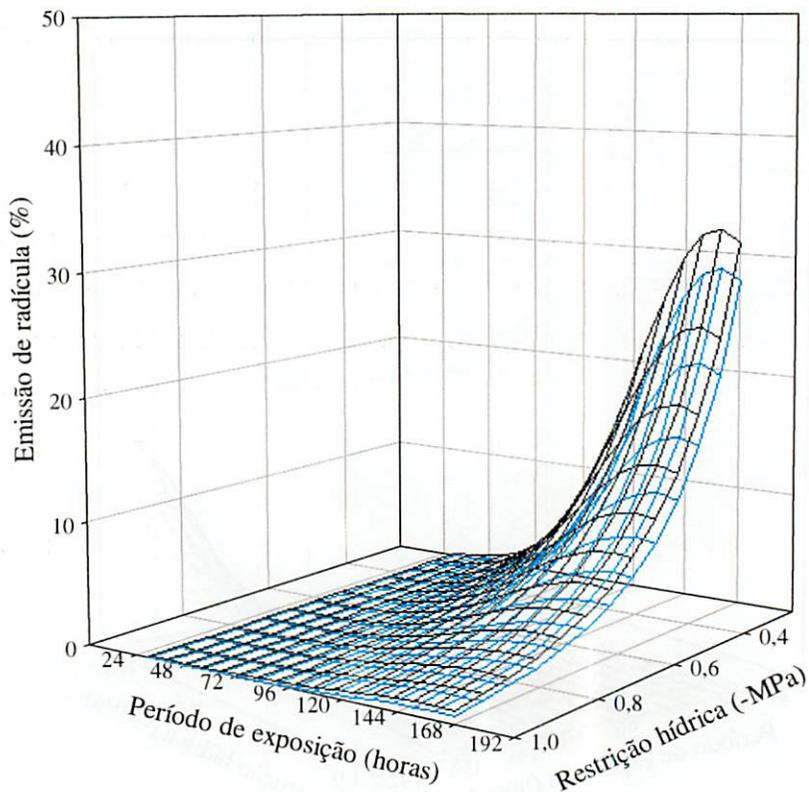
O início da emissão de radículas de sementes expostas ao BDA+ PEG 6.000, ocorreu após 144 horas, em taxas de 2,7% e 3,5 % na restrição hídrica de -0.4 MPa, e de 1,0% e 1,3 % na restrição hídrica de -0.6 MPa, para sementes não desinfestadas e desinfestadas, respectivamente. Ao final de 168 horas de exposição das sementes foram registradas taxas de emissão de radículas de 7,0% e 9,0 %, à restrição hídrica de -0.4 MPa, de 2,6% e 3,5 % à restrição hídrica de -0.6 MPa, e de 1,0% e 1,2 % à restrição hídrica de -0.8 MPa, para sementes não desinfestadas e desinfestadas, respectivamente. Não ocorreu emissão de radículas nos tratamentos de restrição hídrica de -1 MPa (Figura 2). Houve uma tendência de maior porcentagem de emissão de radículas, nos tratamentos em que as sementes foram submetidas ao pré-tratamento com hipoclorito de sódio, provavelmente pelas mesmas razões apresentadas para as sementes expostas ao BDA (testemunha). Fato semelhante foi observado nas sementes expostas ao BDA + manitol, ou seja, as maiores taxas de emissão de radículas foram observadas nos tratamentos em que as sementes foram desinfestadas (Figura 3).



Desinfestada $n = -21,8800 - 5,1141.x + 0,2295.y - 0,0006.y^2$

Não desinfestada $n = -22,1633 - 5,1141.x + 0,2295.y - 0,0006.y^2$

Figura 2 - Estimativa da porcentagem acumulada de emissão de radículas de sementes de feijoeiro (P), em função da restrição hídrica (x) e do tempo de exposição (y) destas ao substrato BDA + PEG 6.000, tanto para sementes desinfestadas como para não desinfestadas, em que, $P = (e^n / 1+e^n) \times 100$. UFLA, Lavras - MG, 1999.



■	Desinfestada	$n = -16,8733 - 12,2750.x + 0,2241.y - 0,0006.y^2$
■	Não desinfestada	$n = -17,1566 - 12,2750.x + 0,2241.y - 0,0006.y^2$

Figura 3 - Estimativa da porcentagem acumulada de emissão de radículas de sementes de feijoeiro (P), em função da restrição hídrica (x) e do tempo de exposição (y) destas ao substrato BDA + manitol, tanto para sementes desinfestadas como não desinfestadas, em que, $P = (e^n / 1+e^n) \times 100$. UFLA, Lavras - MG, 1999.

O início da emissão de radículas de sementes expostas ao BDA + manitol, ocorreu após 120 horas, no tratamento de restrição hídrica de -0,4 MPa, em taxas que variaram de 2,2% a 2,9 %. Após 144 horas foram registradas taxas de 9,6% e 12,4 % na restrição hídrica de -0,4 MPa, e de 1,0% e 1,2% na restrição hídrica de -0,6 MPa. Já após 168 horas de exposição ocorreram taxas de emissão de radículas entre 20,5% e 25,6 %, no tratamento de restrição hídrica de -0,4 MPa, e entre 2,1% e 2,9%, na restrição hídrica de -0,6 MPa. Não ocorreu emissão de radículas nos tratamentos de - 0,8 MPa e -1 MPa. De maneira geral foi observado que, a porcentagem acumulada de emissão de radículas de sementes de feijoeiro, diminuiu ao longo do período de exposição, à medida que o potencial hídrico do substrato foi reduzido, tanto para sementes desinfestadas como não desinfestadas. De acordo com alguns autores, a velocidade de absorção de água pelas sementes diminui à medida que o potencial hídrico, do meio externo, se torna mais negativo, aumentando conseqüentemente o período necessário para que ocorra a emissão da radícula (Bradford, 1986; Bewley e Black, 1994). Este fato, também foi observado por alguns autores, em estudos envolvendo o controle da hidratação de sementes de feijoeiro (Prisco e O'Leary, 1970; Magalhães e Carelli, 1972; Shioga, 1990), de guaratã (Córdoba, Lima e Borges, Borges et al., 1995) e de soja (Del Giúdice, 1996). Foi observado ainda que, em potenciais hídricos mais negativos que -0,6 MPa, o substrato BDA + PEG 6.000 foi mais efetivo em inibir a emissão de radículas do que o BDA + manitol. Prisco e O'Leary (1970) mostraram em seus estudos que, o uso de preparações de polietileno glicol (Carbowax 1540), para o condicionamento de sementes de feijoeiro, foi mais efetivo em inibir a emissão de radículas do que soluções de NaCl em potenciais hídricos similares, que causaram efeitos tóxicos. De acordo com Del Giúdice (1996), preparações de PEG 6.000 também são mais efetivas em inibir a emissão de radículas de sementes de soja do que soluções de manitol em

potenciais osmóticos similares. A ocorrência de 1,0% de emissão de radículas no tratamento de restrição hídrica de -0,8 MPa, em BDA + PEG 6.000, pode ter sido devido às características das sementes e/ou do substrato. A menor consistência do BDA + PEG 6.000, quando comparada com a consistência do BDA + manitol, em potenciais hídricos mais negativos, pode ter proporcionado uma maior superfície de contato das sementes com o substrato. A atividade de colônias de microrganismos, como fungos dos gêneros *Fusarium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, entre outros associados às sementes (Figura 4), provavelmente pode ter contribuído com alterações no potencial hídrico do substrato, ocasionando valores menos negativos e, conseqüentemente, a germinação das sementes mais vigorosas. Por outro lado, a presença de fungos em condições de alta umidade das sementes, pode ocasionar rápida perda de viabilidade das mesmas (Agarwal e Sinclair, 1987; Bewley e Black, 1994).

O resumo da análise de variância dos dados referentes à germinação das sementes, após o pré - condicionamento destas durante 168 horas, com posterior secagem, é mostrado na Tabela 3A. O tipo de substrato ($P > 0,0159$), bem como o pré-tratamento de assepsia superficial das sementes ($P > 0,0020$), influenciaram significativamente a capacidade destas em originarem plântulas normais. O pré-condicionamento das sementes em BDA + manitol por 168 horas, com posterior secagem das mesmas, propiciou em média 95,0% de plântulas normais, em contraste a 86,0% daquelas pré-condicionadas em BDA + PEG 6.000. A porcentagem média de plântulas normais, obtida nos tratamentos em que as sementes foram pré-condicionadas em BDA + manitol, à restrição hídrica de -0,8 MPa (99,0 %), superou ($P > 0,008$) a média dos tratamentos de restrição hídrica de -1MPa (91 %). Já as sementes pré - condicionadas após o pré-tratamento de assepsia superficial, apresentaram em média 85,0% de plântulas normais, contra 96,0% nos tratamentos em que foram utilizadas sementes não desinfestadas.

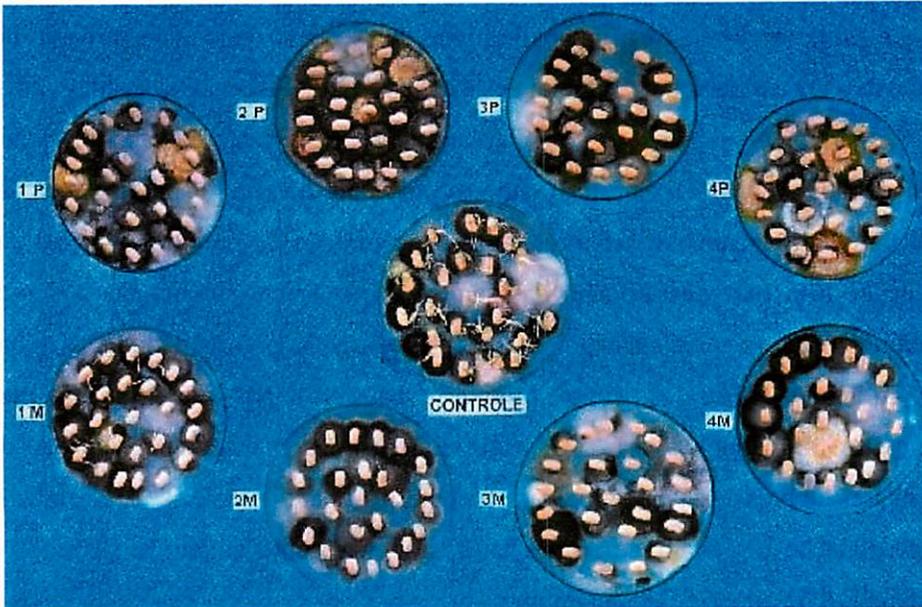


Figura 4 - Incidência de fungos em sementes de feijoeiro expostas ao BDA (controle) e ao BDA modificado pela adição de soluções de PEG 6.000 (P) ou de manitol (M), à restrições hídricas de -0,4 MPa (1), -0,6 MPa (2), -0,8 MPa (3) e -1 MPa (4). UFLA, Lavras - MG, 1999.

O parâmetro de sementes mortas revelou efeito significativo ($P > 0,0008$) da interação entre o tipo de substrato e o pré - tratamento de assepsia das sementes (Tabela 4A). Nos tratamentos em que as sementes foram desinfestadas e pré-condicionadas em BDA + PEG 6.000, houve em média, 8 % de ocorrência de sementes mortas, em contraste a 1% nos tratamentos em que estas não foram desinfestadas. Não ocorreram sementes mortas nos tratamentos em BDA + manitol. A menor consistência do BDA + PEG 6.000, em relação à consistência mais firme do BDA + manitol, em potenciais hídricos mais

negativos, proporciona uma maior área de exposição das sementes ao substrato, o que pode ter limitado a disponibilidade de oxigênio para a respiração das sementes em embebição. Segundo relatos de Mexal, Fisher, Osteryoung, et al (1975), algumas preparações de polietileno glicol podem causar efeitos tóxicos por contaminantes. Os mesmos autores afirmam que, a disponibilidade de oxigênio é inversamente proporcional à concentração de polietileno glicol em solução. Já o pior desempenho das sementes que foram submetidas ao pré-tratamento de assepsia superficial, antes destas serem pré-condicionadas sobre os diferentes substratos, sugere que este causou danos à germinação das sementes. Babadoost, Derie e Gabrielson (1996) observaram que a imersão de sementes de brassicas, em solução de hipoclorito de sódio (0,525 %), prejudicou a germinação e o vigor de alguns lotes, principalmente quando o período de tratamento foi superior a cinco minutos.

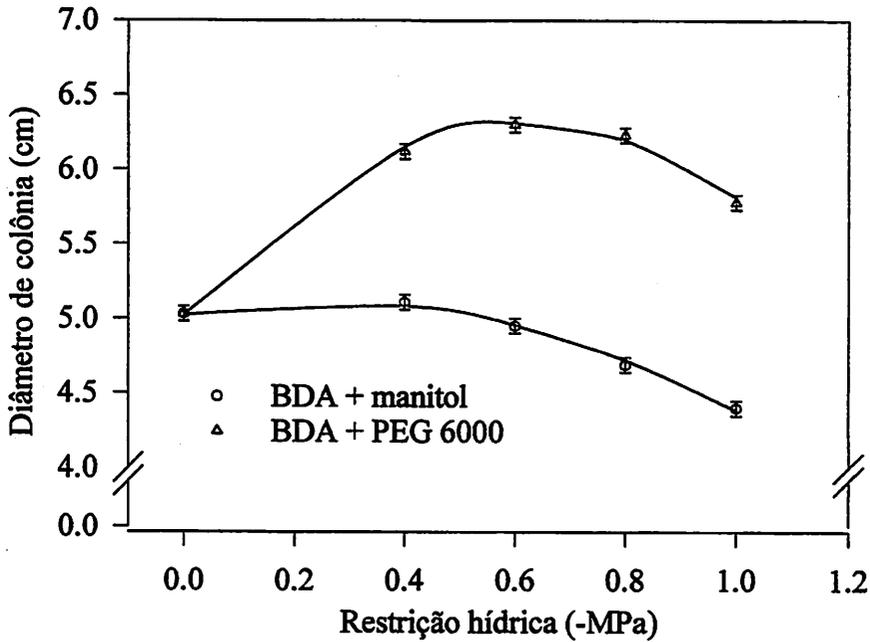
4.2 Segunda etapa: Crescimento micelial de *Colletotricum lindemuthianum* em relação à restrição hídrica do substrato agarizado

O diâmetro médio das colônias de *C. lindemuthianum* foi significativamente ($P > 0,0001$) influenciado pelo tipo de substrato (BDA + PEG 6.000 ou BDA + manitol), em cada nível de restrição hídrica testado (Tabela 5A). O resumo da análise de regressão dos dados, relativos ao diâmetro das colônias, em função da restrição hídrica do BDA (testemunha), pela adição de PEG 6.000 ou manitol, é apresentado na Tabela 6A. O diâmetro das colônias de *C. lindemuthianum* foi estimulado positivamente pela adição de concentrações crescentes de manitol ao meio de cultura básico (BDA) até a faixa de restrição hídrica entre -0,6 e -0,8 MPa, onde este fungo apresentou um crescimento ótimo e, posteriormente, tendeu ao declínio, até a faixa de restrição hídrica de -1 MPa, superando os demais tratamentos em todos os níveis de restrição hídrica estudados. Já o diâmetro médio das colônias de

C. lindemuthianum, crescidas em BDA + PEG 6.000, mostrou-se semelhante à testemunha, até a faixa de restrição hídrica de -0,6 MPa e, posteriormente, tendeu ao declínio, em potenciais hídricos mais negativos (Figura 5). Esses resultados mostram que o ajuste do potencial hídrico é um importante parâmetro a ser considerado em estudos envolvendo o crescimento micelial de *C. lindemuthianum* em diferentes meios de cultura.

Alguns estudos mostram que o crescimento micelial de fungos como *Phytophthora cinnamomi* e *Alternaria tenuis* (Adebayo e Harris, 1971), *Verticillium dahliae* (Ioannou e Schneider, Grogan et al., 1977), *Fusarium roseum* "Graminearum" (Wearing e Burges, 1979), *Fusarium oxysporum* (Brownell e Schneider, 1985), *Cryphonectria parasitica* (Gao e Shain, 1995), é estimulado em potenciais hídricos na faixa de zero a - 2 MPa, com posterior declínio em potenciais hídricos mais negativos. Alam, Joyce e Wearing (1996) observaram que, o diâmetro de colônias de *Alternaria alternata* e *Botrytis cinerea*, desenvolvidas em BDA, modificado pela adição de KCl, CaCl₂, sacarose ou mistura de sais, foi inicialmente estimulado na faixa de potenciais hídricos de -0,4 a -1 MPa, e decresceu progressivamente na faixa entre -1 a -8 MPa.

O aumento no diâmetro médio das colônias de *C. lindemuthianum*, crescidas em BDA + manitol, em relação aos demais substratos, provavelmente pode ter sido ocasionado pela fonte de carbono adicional, fornecida pelo manitol.



$$Y = 5,0256 + 4,1774.x_m - 3,3879.x_m^2 + 0,6715.x_p - 1,3149.x_p^2$$

$$R^2 = 0,98$$

Figura 5 - Diâmetro médio de colônias de *C. lindemuthianum* (Y), aos 8 dias de idade, em BDA (testemunha) e em função de diferentes níveis de restrição hídrica do BDA (x_i), obtidos pela adição de soluções de manitol (x_m) ou de PEG 6.000 (x_p). As barras na vertical representam o erro padrão. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Segundo Mathur, Barnett e Lilly (1950), o manitol é facilmente metabolizado por *C. lindemuthianum*. Neste sentido, encontra-se na literatura, que o uso de sacarose para ajustar o potencial hídrico do meio de cultura, proporcionou um aumento no diâmetro médio das colônias de *Ascochyta paspali* (Morley, Williams e Price, 1993), *Cryphonectria parasitica* (Gao e Shain, 1995), *Alternaria alternata* e *Botrytis cinerea* (Alam, Joyce e Wearing, 1996), quando comparado ao uso de sais.

Já o diâmetro reduzido das colônias de *C. lindemuthianum*, em BDA + PEG 6.000, em relação aos demais tratamentos, pode ser explicado pelos efeitos diretos da restrição hídrica do substrato, no crescimento do fungo. Mexal e Reid (1973) observaram que o polietileno glicol é um soluto apropriado para induzir o estresse hídrico em fungos, pois, embora possa ser absorvido em menor extensão, não é metabolizado como os açúcares, e nem é tóxico em altas concentrações, como os sais podem ser.

Entretanto, os tratamentos de restrições hídricas em BDA + PEG 6.000, podem ter originado potenciais hídricos mais negativos que aqueles obtidos em BDA + manitol, pois, de acordo com Michel e Kaufmann (1973) e Michel, (1983) pode ocorrer sinergismo no potencial hídrico de preparações de polietileno glicol contendo outros solutos. A menor consistência observada no substrato BDA + PEG 6.000, em valores de restrições hídricas mais negativos, também pode ter provocado uma menor expansão superficial das colônias fúngicas, devido ao crescimento do fungo em profundidade.

Em termos de coloração e morfologia, as colônias de *C. lindemuthianum*, crescidas em BDA + PEG 6.000, apresentaram-se mais escuras ao centro, com bordos hialinos e micélio aparentemente mais submerso, em relação aos demais tratamentos, principalmente em potenciais hídricos mais negativos. Em BDA + manitol, as colônias do fungo apresentaram coloração cinza, similar à testemunha, com tonalidades mais escuras ao centro e mais clara

nas bordas, e uma maior proporção de micélio aéreo que os demais tratamentos. A coloração das colônias crescidas em BDA + manitol, tenderam a ficar de tonalidades mais claras, à medida que o potencial hídrico foi reduzido (Figura 6).

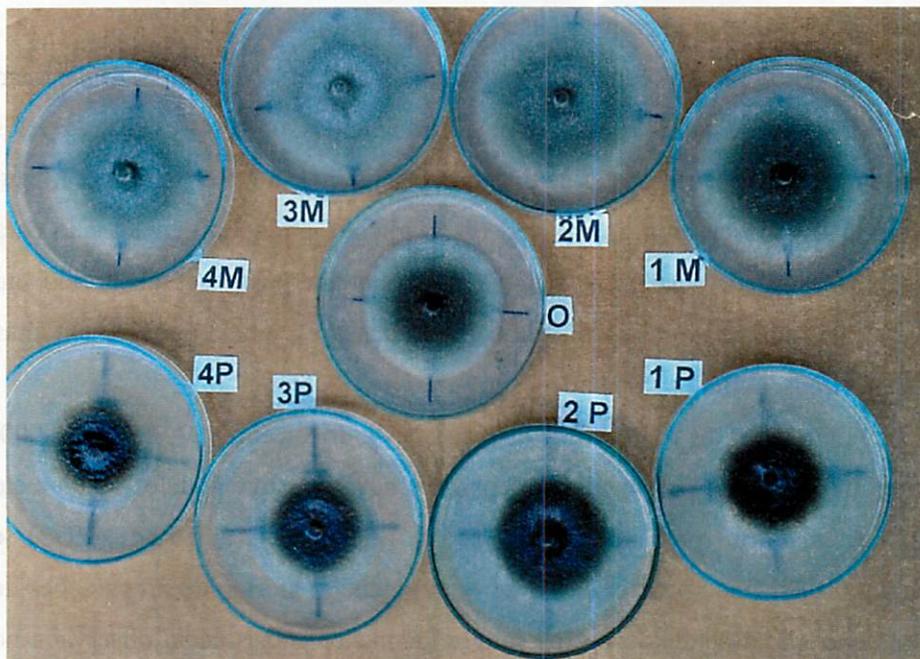


Figura 6 - Colônias de *C. lindemuthianum* crescidas em BDA (O), e em BDA modificado pela adição de PEG 6.000 (P) ou manitol (M) em quatro níveis de restrição hídrica: -0,4 MPa (1), -0,6 MPa (2), -0,8 MPa (3) e -1 MPa (4). UFLA - Lavras - MG, 1999.

Alam, Joyce e Wearing (1996) observaram que, a cor das colônias de *Alternaria alternata*, crescidas em meio de cultura modificado pela adição de KCl, CaCl₂ ou sacarose, também foi influenciada pelo tipo de soluto utilizado para o ajuste do potencial hídrico do substrato. Já Morley, Williams e Price (1993) observaram que a coloração de colônias de *Ascochyta paspali* não foi afetada pelos diferentes sais, porém, variou com o potencial hídrico.

4.3 Terceira etapa: Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro

O potencial hídrico de um substrato é um fator importante no desenvolvimento de fungos fitopatogênicos em geral. Desta forma, a umidade das sementes é um fator que pode condicionar a ação de um fungo fitopatogênico por ocasião do processo de inoculação.

O grau de umidade atingido pelas sementes nos diferentes tratamentos, variou significativamente em função da presença ou da ausência de *C. lindemuthianum*, no tratamento testemunha (BDA) ($P > 0,0199$) e nos tratamentos em BDA + manitol ($P > 0,0001$) e, em função do período de exposição das mesmas ($P > 0,0001$). O grau de umidade médio, atingido pelas sementes no tratamento testemunha, diferiu da média dos tratamentos em BDA + manitol ($P > 0,0001$), assim como estes diferiram do grau de umidade das sementes não embebidas ($P > 0,0001$)(Tabela 7A). O grau de umidade médio apresentado pelas sementes não embebidas foi de 9,50%. As sementes mantidas em BDA por 30 horas, nos tratamentos controle (ausência de *C. lindemuthianum*), atingiram 35,28% de umidade, ao passo que nos tratamentos de inoculação (presença de *C. lindemuthianum*), atingiram 36,62% de umidade. Já as sementes expostas a BDA + manitol, pelo mesmo período de tempo, atingiram valores de umidade de 30,78% nos tratamentos controle, e de 33,70% nos tratamentos de inoculação. O grau de umidade das sementes

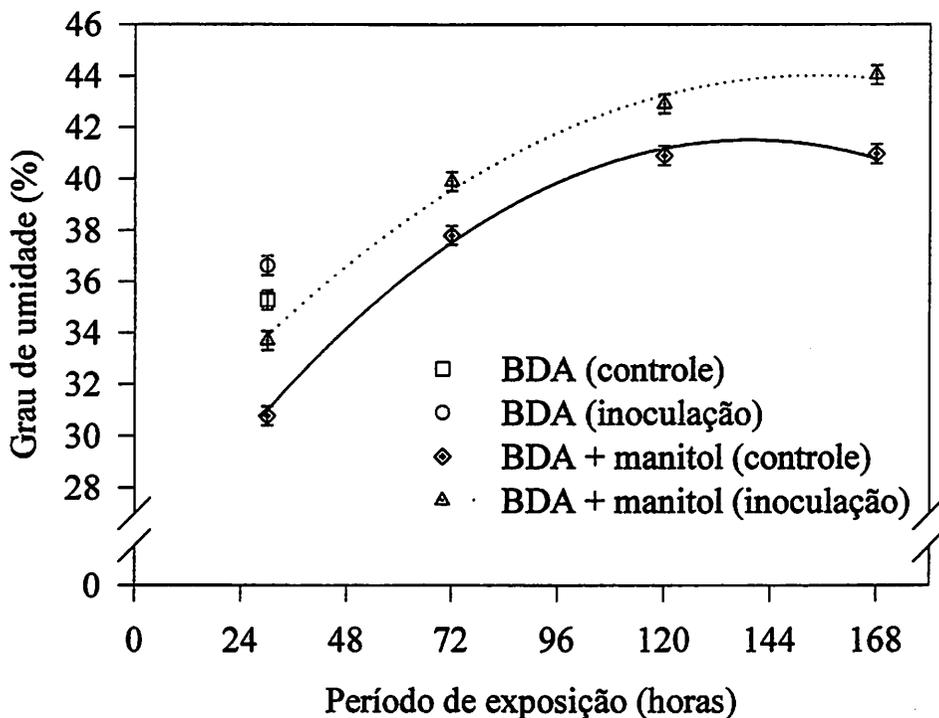
elevou-se com o aumento do período de exposição destas em BDA + manitol, que atingiram valores de umidade de 38,13% e 40,05% após 72 horas, 40,61% e 42,79% após 120 horas, e 40,98% e 44,04% após 168 horas, nos tratamentos controle e nos de inoculação, respectivamente. De maneira geral, houve uma rápida absorção de água pelas sementes, principalmente nas primeiras 30 horas de embebição, e entre o período de 120 e 168 horas, o grau das sementes pouco se alterou (Figura 7), não ocorrendo a emissão de radículas.

De acordo com Bradford (1986, 1995), a emissão de radícula pela semente ocorre quando esta atinge um valor crítico de umidade (platô), alcançado em função do potencial hídrico do ambiente e do período de hidratação das sementes. Observações feitas, durante a condução dos ensaios, mostraram que a exposição das sementes de feijoeiro a BDA (testemunha), pelo período de 72 horas, acarretou a germinação de grande parte das sementes, que apresentaram valores de umidade entre 47,30% e 48,82 %.

Estes resultados concordam com observações feitas por Shioga (1990), de que sementes de feijoeiro necessitam de no mínimo 48 % a 50% de umidade para emissão de radículas. O fato das sementes não terem emitido radícula nos tratamentos em BDA + manitol, provavelmente ocorreu devido à restrição hídrica do substrato, que reduziu a absorção de água pelas sementes, não permitindo que estas atingissem o valor mínimo de umidade exigido para a emissão de radículas.

As sementes expostas a colônias de *C. lindemuthianum* (tratamentos de inoculação), atingiram em média 40,15% de umidade, ao passo que aquelas expostas aos meios de culturas (tratamentos de controle), atingiram em média, 37,60% de umidade. Essa diferença ocorreu devido à presença de micélio de *C. lindemuthianum* em atividade, que pelo metabolismo dos açúcares presentes no substrato agarizado, provavelmente acarretou no aumento do potencial hídrico do ambiente de hidratação das sementes, proporcionado maior

disponibilidade de água para a germinação das mesmas nos tratamentos de inoculação, do que nos de controle (Figura 8).



$$\cdots Y_1 = 28,4002 + 0,2023 \cdot t - 0,0007 \cdot t^2 \quad R^2 = 0,99$$

$$\text{—} Y_2 = 24,4581 + 0,2446 \cdot t - 0,0009 \cdot t^2 \quad R^2 = 0,98$$

Figura 7 - Grau médio de umidade atingido pelas sementes (Y), em função de diferentes período de exposição destas a BDA + manitol (t) e a BDA por 30 horas (testemunha), na presença (Y₁) e na ausência (Y₂) de *C lindemuthianum*. As barras na vertical representam o erro padrão. UFLA, Lavras - MG, 1999.

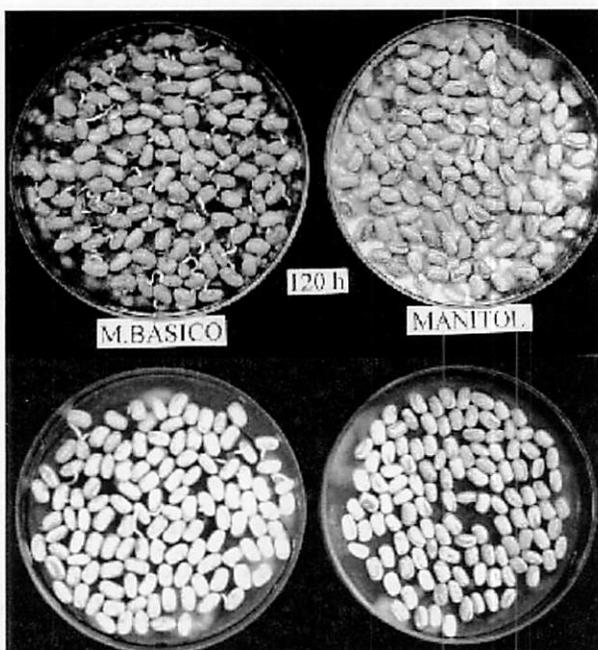


Figura 8 - Emergência de radículas de sementes de feijoeiro nos tratamentos controle (placas inferiores), e nos tratamentos de inoculação de *C. lindemuthianum* (placas superiores), pelo período de 120 horas de exposição destas a BDA (testemunha)(esquerda) e a BDA + manitol (direita). UFLA, Lavras - MG, 1999.

Estes resultados indicam que o potencial hídrico do substrato variou durante o período de inoculação das sementes, e nesse caso, o uso de restrições hídricas do BDA + manitol inferiores a -1 MPa, ou de períodos de exposição superiores a 168 horas, pode resultar na germinação das sementes, e inviabilizar a secagem para o posterior aproveitamento das mesmas. Foi observado que, após o período de secagem lenta das sementes, à temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa entre 70% e 80%, durante o período de três dias, ocorreram 15 sementes (9%) germinadas no tratamento de inoculação das mesmas por 168

horas. A alta umidade alcançada pelas sementes nesse tratamento, associada à umidade adicional adquirida após a lavagem das mesmas, e à elevada umidade relativa do ambiente de secagem, deve ter favorecido a continuidade do processo de germinação das sementes mais vigorosas.

A análise de variância dos dados relativos à secagem das sementes (Tabela 8A), mostrou que houve interação significativa entre a modalidade de exposição (inoculação e controle) e o período de exposição das sementes ($P > 0,0001$). Portanto, a secagem lenta das sementes não foi capaz de uniformizar o grau de umidade das mesmas. O grau de umidade das sementes não embebidas foi de 9,62%, e diferiu da média dos demais tratamentos. O grau de umidade das sementes tratadas, após a secagem das mesmas, variou de 12,79% à 15,65% nos tratamentos controles, e de 18,44% à 19,33% nos tratamentos de inoculação. De maneira geral os tratamentos controle apresentaram menores conteúdos de umidade que os respectivos tratamentos de inoculação, principalmente quando as sementes foram expostas pelo período de 30 horas (Tabela 3).

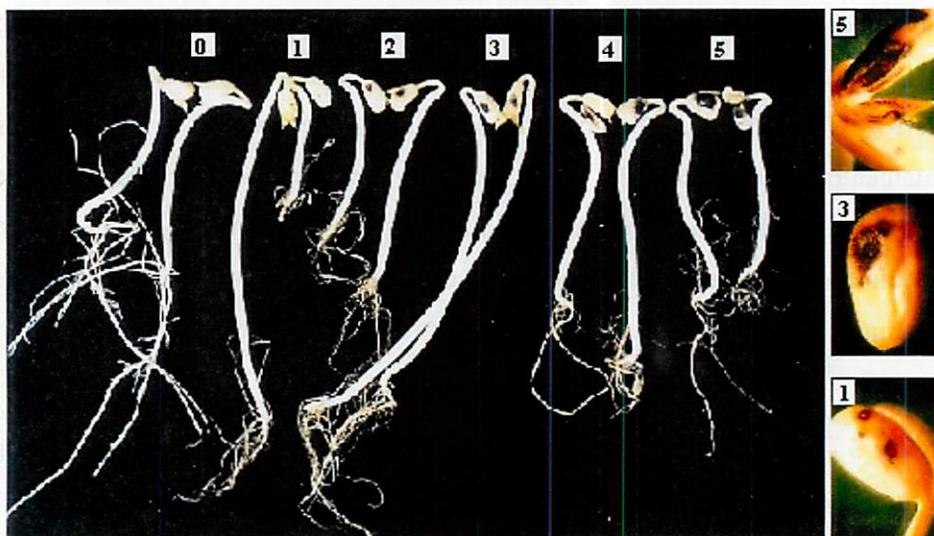
Tabela 3 - Grau médio de umidade apresentado pelas sementes dos tratamentos de inoculação e controle, após a secagem das mesmas. UFLA, Lavras-MG, 1999.

Tratamentos	Controle	Inoculação
BDA por 30 horas	13,22 b B	19,33 a A
BDA + manitol por 30 horas	12,79 b B	19,07 a A
BDA + manitol por 72 horas	15,61 a B	18,47 a A
BDA + manitol por 120 horas	15,22 a B	18,44 a A
BDA + manitol por 168 horas	15,65 a B	19,15 a A

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre colunas (D.M.S.= 0,67) e minúscula entre linhas (D.M.S.= 0,96), não diferem entre si pelo teste de Tuckey à 5% de probabilidade.

4.3.1 Índice de ocorrência e localização de *Colletotrichum lindemuthianum* nas sementes de feijoeiro inoculadas

Não foram constatadas plântulas de feijão com sintomas de antracnose oriundas das sementes expostas aos meios de cultura na ausência de *C. lindemuthianum* (controle). Por outro lado, os tratamentos de inoculação das sementes, resultaram na emergência de plântulas com sintomas da referida doença, em diferentes graus de severidade (Figura 9).

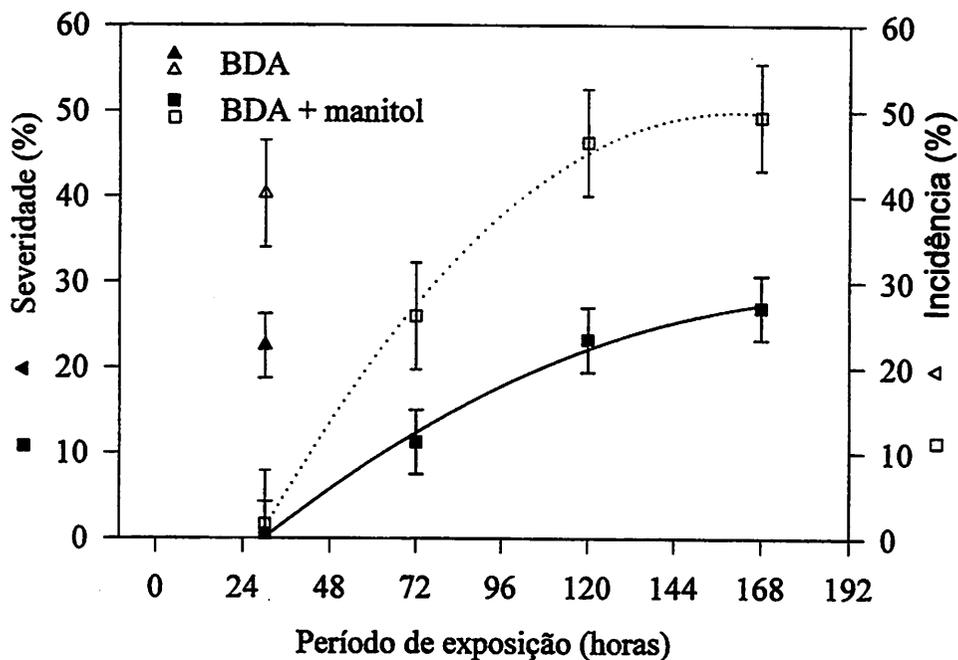


* Números em arábicos = severidade dos sintomas de antracnose

Figura 9 - Severidade dos sintomas de antracnose em plântulas de feijoeiro, avaliadas por uma escala de notas de zero a cinco, provenientes de sementes inoculadas com *C. lindemuthianum*. UFLA, Lavras - MG, 1999.

O período de exposição das sementes a *C. lindemuthianum*, nos tratamentos em BDA + manitol, influenciou significativamente a incidência de plântulas infectadas ($P > 0,0010$), bem como a severidade dos sintomas de antracnose ($P > 0,0022$) observados nas mesmas durante as avaliações da sanidade das sementes com o tegumento. Em média, não foi detectada diferença significativa destes parâmetros entre os tratamentos em BDA + manitol e o tratamento testemunha (Tabela 9A). No tratamento de inoculação em BDA por 30 horas (testemunha), ocorreram em média 40,30% de plântulas infectadas por *C. lindemuthianum*, com índice médio de 22,50% de severidade dos sintomas, ao passo que no tratamento de restrição hídrica (BDA + manitol), pelo mesmo período de exposição das sementes (30 horas), ocorreram em média, 1,60% de incidência de plântulas infectadas e 0,50% severidade dos sintomas. O prolongamento do período de exposição das sementes ao patógeno, para 72 horas, pela restrição hídrica do BDA com manitol, proporcionou a ocorrência de 26,00% de plântulas infectadas e 11,30% de severidade dos sintomas, ao passo que o prolongamento deste período para 120 horas, resultou em 46,00% plântulas infectadas e 26,00% de severidade dos sintomas. Já no tratamento de inoculação das sementes por 168 horas, foram observados valores de 49,30 % de plântulas infectadas e, 27,00% de severidade dos sintomas de antracnose nas mesmas. (Figura 10).

A Tabela 10A mostra que, o período de exposição das sementes a *C. lindemuthianum* nos tratamentos em BDA + manitol, influenciou significativamente a incidência de plântulas infectadas ($P > 0,0004$), bem como a severidade dos sintomas de antracnose ($P > 0,0011$) observados nas mesmas durante as avaliações da sanidade das sementes sem o tegumento. Entretanto, pode ser observado também, que a média da testemunha diferiu da média dos tratamentos de restrição hídrica, tanto para incidência de plântulas infectadas ($P > 0,0042$) quanto para a severidade dos sintomas de antracnose ($P > 0,0148$).



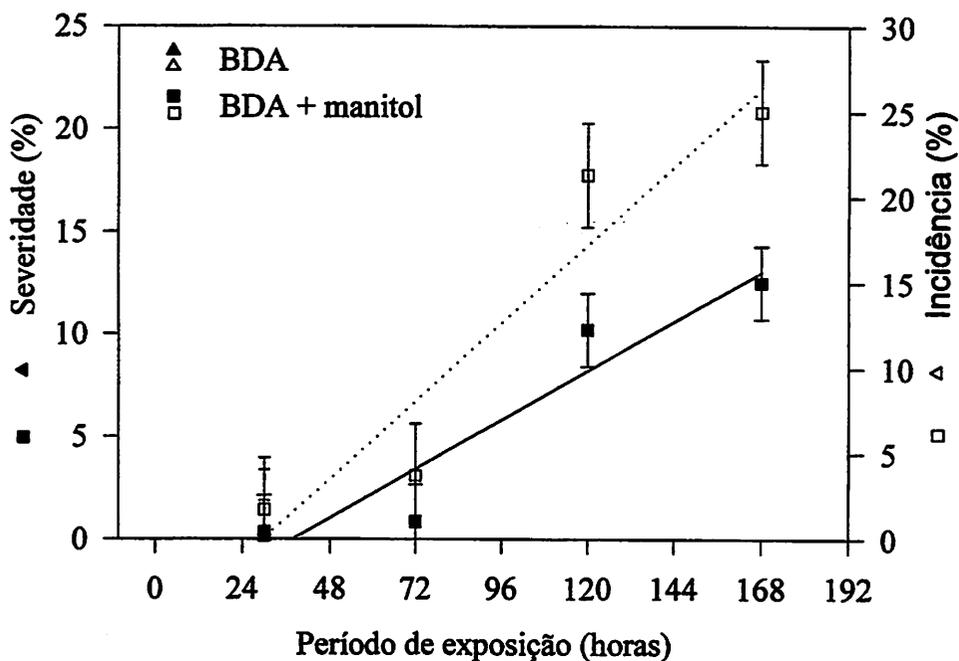
$$\text{..... } Y_1 = -23,6521 + 0,9120 \cdot t - 0,0028 \cdot t^2 \quad R^2 = 0,99$$

$$\text{——— } Y_2 = -10,7962 + 0,3933 \cdot t - 0,0010 \cdot t^2 \quad R^2 = 0,99$$

Figura 10 - Incidência média de plântulas infectadas (Y_1) e severidade média dos sintomas de antracnose (Y_2), determinada pelo teste de sanidade (rolo de papel) das sementes de feijoeiro com tegumento, em função de diferentes tempos de exposição destas a *C. lindemuthianum* em BDA + manitol (t) e em BDA por 30 horas (testemunha). As barras na vertical representam o erro padrão. UFLA, Lavras - MG, 1999.

O teste de sanidade das sementes, sem o tegumento, mostrou valores de 0,33% de incidência de plântulas infectadas, e 0,07% e de severidade dos sintomas de antracnose para tratamento testemunha (BDA), contra 1,67% de incidência e 0,33% de severidade dos sintomas no tratamento de restrição hídrica (BDA + manitol) pelo mesmo período de exposição das sementes a *C. lindemuthianum* (30 horas). O aumento do período de inoculação das sementes para 72 horas, aumentou a incidência de plântulas infectadas para 3,87% e a severidade dos sintomas de antracnose para 0,87%. Já o aumento do período de inoculação das sementes para 120 e para 168 horas, proporcionou, respectivamente, valores de 21,30% e 25,00% de incidência de plântulas infectadas, e 10,20% e de 12,50% de severidade dos sintomas de antracnose nas mesmas. (Figura 11).

Tanto pelo teste de sanidade das sementes com o tegumento, quanto para sementes sem o tegumento, foi observado que, o aumento do período de exposição destas ao inóculo de *C. lindemuthianum*, em BDA + manitol, causou aumento progressivo na incidência de plântulas infectadas pelo respectivo fungo, e na severidade dos sintomas apresentado pelas mesmas. Tendência similar foi obtida por Tanaka, Menten e Mariano (1989), que verificaram um aumento progressivo do grau de associação e do número de sementes de algodoeiro infectadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, à medida que o período de exposição das sementes às colônias deste fungo foi aumentado. Entretanto, o período de exposição das sementes às colônias fúngicas em BDA, pode ser aumentado até certo limite, pois a partir de certo período, corre-se o risco das sementes germinarem, inviabilizando a secagem das mesmas para o aproveitamento em estudos posteriores.



$$\text{..... } Y_1 = -5,6263 + 0,1903 \cdot t \quad R^2 = 0,90$$

$$\text{——— } Y_2 = -3,7567 + 0,0998 \cdot t \quad R^2 = 0,89$$

Figura 11 - Incidência média de plântulas infectadas (Y_1) e severidade média dos sintomas de antracnose (Y_2), determinada pelo teste de sanidade (rolo de papel) das sementes de feijoeiro sem o tegumento, em função de diferentes períodos de exposição destas a *C. lindemuthianum* em BDA + manitol (t) e em BDA por 30 horas (testemunha). As barras na vertical representam o erro padrão. UFLA, Lavras - MG, 1999.

A ocorrência de correlação positiva e significativa entre o grau de umidade atingido pelas sementes, tanto ao final de cada tratamento (G.U.1), como após a secagem lenta (G.U.2), e os parâmetros de incidência e de severidade de antracnose nas plântulas, pelos testes de sanidade das sementes (com e sem o tegumento) (Tabela 11 A), indicam que o aumento do grau de umidade das sementes explica, em parte, o aumento da incidência e da severidade dos sintomas de antracnose nas plântulas.

Os valores quase nulos de incidência e de severidade dos sintomas de antracnose observados na análise sanitária das sementes com o tegumento, do tratamento de inoculação em BDA + manitol por 30 horas, contra os altos valores verificados para a testemunha, indicam que o processo de infecção das sementes por *C. lindemuthianum* foi afetado pela restrição hídrica. De acordo com Cook e Papendick (1978), a diminuição do potencial hídrico pode reduzir a velocidade ou paralisar a patogênese de fungos. Como o grau de umidade atingido pelas sementes no tratamento testemunha foi superior ao observado em BDA + manitol, pelo mesmo período de exposição, a infecção das sementes, em contato com colônias de *C. lindemuthianum*, provavelmente, pode estar relacionada a um patamar mínimo de umidade nos tecidos da semente, alcançado mais tardiamente nos tratamentos em BDA + manitol e, mais precocemente, em BDA (testemunha). Da mesma maneira, a análise sanitária das sementes sem o tegumento mostra que, períodos inferiores à 72 horas de exposição das sementes de feijoeiro a *C. lidemuthianum*, em BDA + manitol, não foram suficientes para que o inóculo do fungo atingisse os tecidos internos ao tegumento das sementes, ao passo que por períodos maiores de exposição destas ao referido patógeno, resultaram na infecção dos tecidos cotiledonares.

4.3.2 Germinação das sementes e transmissibilidade de *Colletotrichum lindemuthianum* em condições de laboratório

Não ocorreu efeito significativo da inoculação de *C. lindemuthianum* ($P > 0,0882$) na germinação das sementes de feijoeiro, evidenciando a pouca influência deste patógeno na germinação das sementes, como observado por Menezes e Mohan (1982 b) e por Patrício, Borim e Ortolane (1991). Entretanto, em BDA + manitol, houve efeito significativo ($P > 0,0004$) do período de exposição das sementes na capacidade germinativa das mesmas. O contraste entre a porcentagem média de germinação observada nos tratamentos em BDA + manitol (fatorial) e a média dos tratamentos em BDA (testemunha), e os contrastes entre as porcentagens médias de germinação destes e a média das sementes não embebidas, não revelaram diferenças significativas (Tabela 12A). A taxa média de germinação, observada para as sementes não embebidas, foi de 99,65% contra 99,33% para as sementes expostas a BDA + manitol por 30 horas, e 98,66% para as sementes expostas a BDA (testemunha), pelo mesmo período de tempo. O aumento do período de exposição das sementes para 72 horas, em BDA + manitol, pouco alterou a germinação das sementes, que apresentaram taxas médias de 99,66% de germinação. No entanto, a germinação média das sementes reduziu para 98,33% quando as sementes foram expostas pelo período de 120 horas, valor este, próximo ao observado para o tratamento testemunha. Quando o período de exposição das sementes foi aumentado para 168 horas, a taxa de germinação caiu para 96,80% (Figura 12). A redução na germinação das sementes, nos tratamentos em que estas foram expostas ao BDA + manitol por 168 horas, confirma resultados obtidos por outros autores em estudos envolvendo o condicionamento osmótico de sementes de diferentes espécies. O período de sete dias de condicionamento osmótico, acelerou processo de deterioração de sementes de alface (Eira, 1988) e de feijoeiro (Doni Filho, 1992), causando prejuízo ao desempenho germinativo das mesmas.

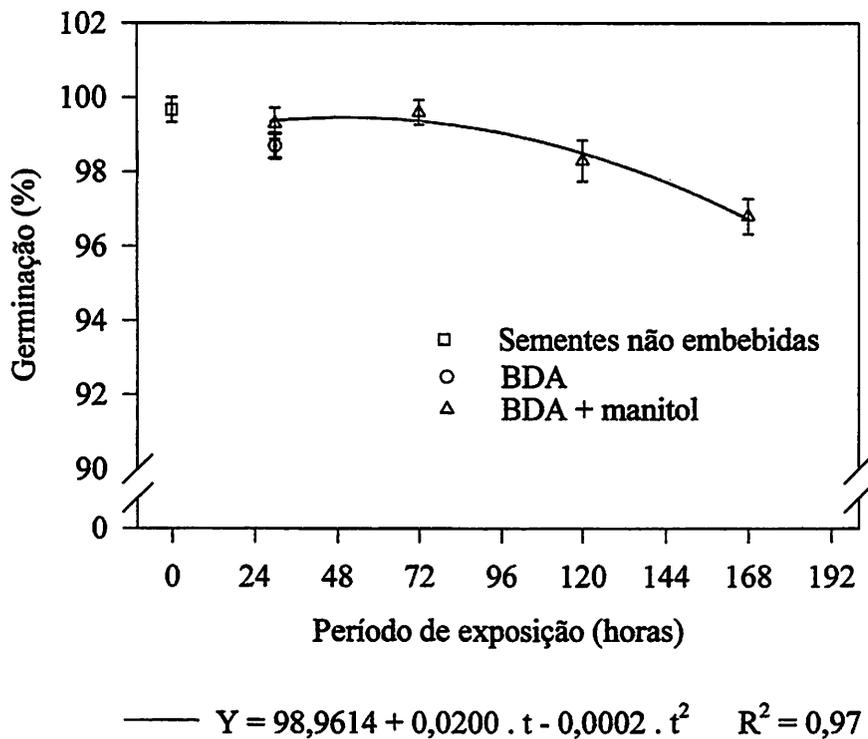


Figura 12 - Porcentagens médias de germinação de sementes de feijoeiro (Y), em função de diferentes períodos de exposição destas a BDA + manitol (t) e a BDA por 30 horas (testemunha). As barras na vertical representam o erro padrão. UFLA, Lavras - MG, 1999.

O resumo da análise de variância dos dados referentes à severidade e à incidência de antracnose nas plântulas, obtidos durante a avaliação do teste de germinação em laboratório, é apresentado na Tabela 13A. Foi verificado que o tempo de exposição das sementes a *C. lindemuthianum*, nos tratamentos de restrição hídrica do BDA com manitol, foi significativo em influenciar a incidência ($P > 0,0004$) e severidade ($P > 0,0007$) dos sintomas da doença. A incidência média de plântulas infectadas no tratamento testemunha, foi de 23,00%, e a severidade dos sintomas de 8,7%. O período de 30 horas de exposição das sementes a *C. lindemuthianum*, em BDA + manitol, não foi efetivo para infectar as sementes, proporcionando índices médios de incidência e de severidade de 0,70% e de 0,20%, respectivamente. Silva (1997) relata que a inoculação de sementes de feijoeiro cultivar IAC Carioca, sobre colônias de *C. lindemuthianum*, crescidas em meio de vagem, pelo período de exposição de 48 horas, não foi eficiente em evidenciar os efeitos desse patógeno nas sementes. Oliveira (1991) obteve 5,7% de transmissibilidade de *C. lindemuthianum* por sementes de feijoeiro (variedade lustroso), inoculadas durante 24 horas, pelo método de contato destas com colônias do fungo crescidas em meio de cultura MBL.

O aumento do período de inoculação das sementes para 72 horas, pela restrição hídrica do BDA com manitol, proporcionou eficiência similar à testemunha, com uma incidência média de 26,00% de plântulas infectadas, e de 6,40% de severidade dos sintomas da doença. O aumento do período de exposição das sementes a *C. lindemuthianum* para 120 horas, proporcionou índices de 42,00% e de 17,80 % de incidência e de severidade, respectivamente, obtendo-se aumentos em relação à testemunha de aproximadamente 19,66% de incidência de plântulas infectadas e de 9,16% de severidade dos sintomas de antracnose nas plântulas. Já o tratamento de restrição hídrica, por 168 horas de contato das sementes com o inóculo do referido fungo, proporcionou

respectivamente, aumentos de incidência e severidade de 28,00% e 15,76% em relação à testemunha, proporcionando índices médios de 51,00% de incidência de plântulas infectadas, e de 24,00% de severidade dos sintomas da doença (Figura 13).

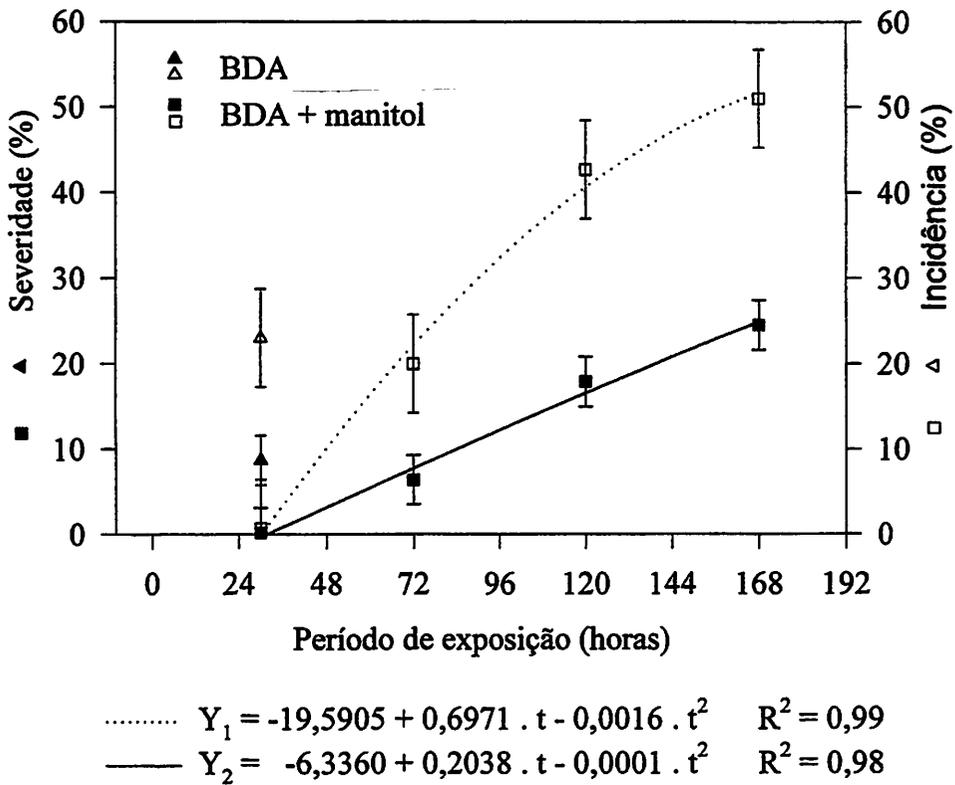


Figura 13 - Incidência média de plântulas infectadas (Y_1) e severidade média dos sintomas de antracnose (Y_2), determinada pelo teste de germinação das sementes de feijoeiro, em função de diferentes períodos de exposição destas a *C. lindemuthianum* em BDA + manitol (t) e em BDA por 30 horas (testemunha). As barras na vertical representam o erro padrão. UFLA, Lavras - MG, 1999.

É necessário ressaltar que, a não padronização do inóculo, pode causar variações na infecção das sementes em contato com o fungo, devido a diferenças de idade do inóculo, de acordo com a posição deste nas colônias fúngicas, ou mesmo pelas características de patogenicidade dos isolados utilizados. A padronização do inóculo, pela inoculação da superfície do substrato com 0,2 ml de uma suspensão de 2×10^6 conídios / ml, proporcionou a cobertura total e uniforme do substrato agarizado ao final do quinto dia de incubação das placas, obtendo-se dessa forma colônias de mesma idade e de mesmo poder infectivo. Assim, o aumento do período de exposição das sementes ao inóculo de *C. lindemuthianum*, pela restrição hídrica do BDA com manitol, proporcionou um aumento progressivo na porcentagem média de plântulas com antracnose (incidência) e no índice médio da doença nas plântulas (severidade), avaliadas durante a germinação das sementes em laboratório.

De acordo com alguns autores, a alta umidade das sementes constitui um dos principais fatores que predispõe estas ao ataque de fungos, podendo acarretar em rápida perda de viabilidade das mesmas (Agarwal e Sinclair, 1987; Bewley e Black, 1994). Pode ser observado pela Tabela 11A que, apesar da análise de variância dos dados não ter detectado efeito significativo da inoculação de *C. lindemuthianum* na germinação das sementes, houve correlações negativas significativas entre a porcentagem de germinação e a incidência de plântulas infectadas e, principalmente, entre a porcentagem de germinação e a severidade dos sintomas de antracnose observados nas plântulas. Pôde ser constatado também pelo teste de germinação, que houve correlação positiva significativa entre os parâmetros de transmissibilidade de *C. lindemuthianum* das sementes para as plântulas (incidência e severidade), e o grau de umidade atingido pelas sementes após cada tratamento de inoculação e após a secagem das mesmas.

Entretanto essas informações não permitem isolar apenas o efeito de

C. lindemuthianum na germinação das sementes, pois outros fatores como, a atuação dos patógenos presentes no lote, ou mesmo o estágio de deterioração das sementes podem estar envolvidos, como discutido anteriormente.

4.3.3 Emergência de plântulas em solo/areia e transmissibilidade de *Colletotrichum lindemuthianum* pelas sementes

Como constatado para a germinação das sementes em laboratório, não houve efeito significativo ($P > 0,2316$) da inoculação das sementes por *C. lindemuthianum* na emergência de plântulas em substrato solo/areia. Da mesma forma, não foram detectadas diferenças significativas entre a emergência média de plântulas oriundas de sementes não embebidas, e a emergência média dos demais tratamentos, evidenciando apenas a influência significativa do período de exposição das sementes ($P > 0,0072$) na emergência das plântulas (Tabela 14 A). As sementes não embebidas apresentaram em média 98,33% de emergência. Já as sementes expostas ao BDA (testemunha) por 30 horas, apresentaram em média 97,56% de emergência, contra 100,00%, 98,60%, 98,45 e 93,80% para as sementes incubadas em BDA + manitol por 30, 72, 120 e 168 horas, respectivamente. Os períodos de 30, 72 e 120 horas de exposição das sementes em BDA + manitol não afetaram a emergência das plântulas, ao passo que, quando as sementes foram expostas por 168 horas, a emergência foi reduzida, em média 4,60% (Figura 14). Estes resultados reforçam aqueles obtidos pelo teste de germinação das sementes em laboratório, ou seja, a incubação de sementes de feijoeiro por 168 horas, em substrato agarizado, tanto na presença quanto na ausência de *C. lindemuthianum*, acelera o processo de deterioração das sementes, prejudicando o posterior desempenho das mesmas.

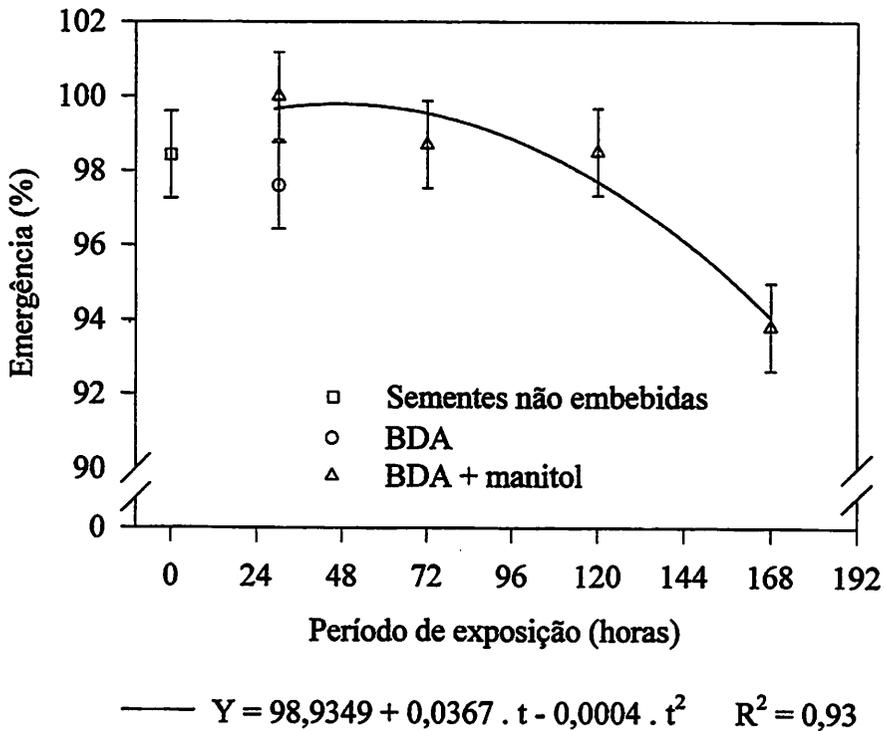


Figura 14 - Porcentagens médias de emergência de plântulas em solo/areia (Y), em função de diferentes períodos de exposição de sementes de feijoeiro a BDA + manitol (t), e a BDA (testemunha) por 30 horas. As barras na vertical representam o erro padrão. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Os sintomas apresentados pelas plântulas emergidas em solo/areia foram similares àqueles apresentados nos testes de sanidade e de germinação em laboratório (Figura 15).



Figura 15 - Sintomas de antracnose em plântulas de feijoeiro, oriundas de sementes inoculadas com *C. lindemuthianum*, por 168 horas pela restrição hídrica do BDA com manitol, aos nove dias após a semeadura destas em solo/areia. UFLA, Lavras - MG, 1999.

O resumo da análise de variância dos dados referentes à severidade e à incidência de antracnose nas plântulas é apresentado na Tabela 15 A. O período de exposição das sementes a *C. lindemuthianum*, nos tratamentos de restrição hídrica do BDA, foi significativo ($P > 0,0099$) em influenciar a incidência e

severidade dos sintomas da doença nas plântulas emergidas. A incidência de plântulas infectadas por *C. lindemuthianum*, observada no tratamento testemunha, foi de 24,44%, e o grau de severidade dos sintomas de antracnose foi de 9,16%, contra 1,73% e 0,43%, respectivamente, para os mesmos parâmetros observados em BDA + manitol, pelo mesmo período de exposição das sementes. O aumento do período de exposição das sementes para 72 horas, pela restrição hídrica do BDA com manitol, proporcionou eficiência similar à testemunha, com 25,76% de plântulas infectadas, e 10,66% de severidade dos sintomas da doença, ao passo que o período de exposição de 120 horas, proporcionou índices médios de 35,10% de plântulas infectadas, e 20,10% de severidade dos sintomas de antracnose nas mesmas, acarretando aumentos, em relação à testemunha, de aproximadamente 10,66% de incidência da doença e em 12,94% de severidade dos sintomas. Já o tratamento de restrição hídrica por 168 horas, resultou em valores médios de incidência e severidade de 43,10% e 23,46%, superando o tratamento testemunha em 18,66% e 14,33%, respectivamente (Figura 16).

Como constatado pelo teste de germinação das sementes em laboratório, apesar da análise de variância dos dados não ter detectado efeito significativo da inoculação de *C. lindemuthianum* na emergência de plântulas em solo/areia, houve correlações negativas significativas entre a porcentagem de emergência de plântulas e a severidade dos sintomas de antracnose observados nas mesmas, não ocorrendo o mesmo para o parâmetro de incidência de plântulas infectadas (Tabela 11 A). Houve correlação positiva significativa entre a incidência de plântulas infectadas, emergidas em solo/areia, e o grau de umidade atingido pelas sementes, após cada tratamento de inoculação, e após a secagem das mesmas. O mesmo comportamento pode ser observado para a correlação entre a severidade dos sintomas nas plântulas, e o grau de umidade atingido pelas sementes, após cada tratamento de inoculação, e após a secagem das mesmas.

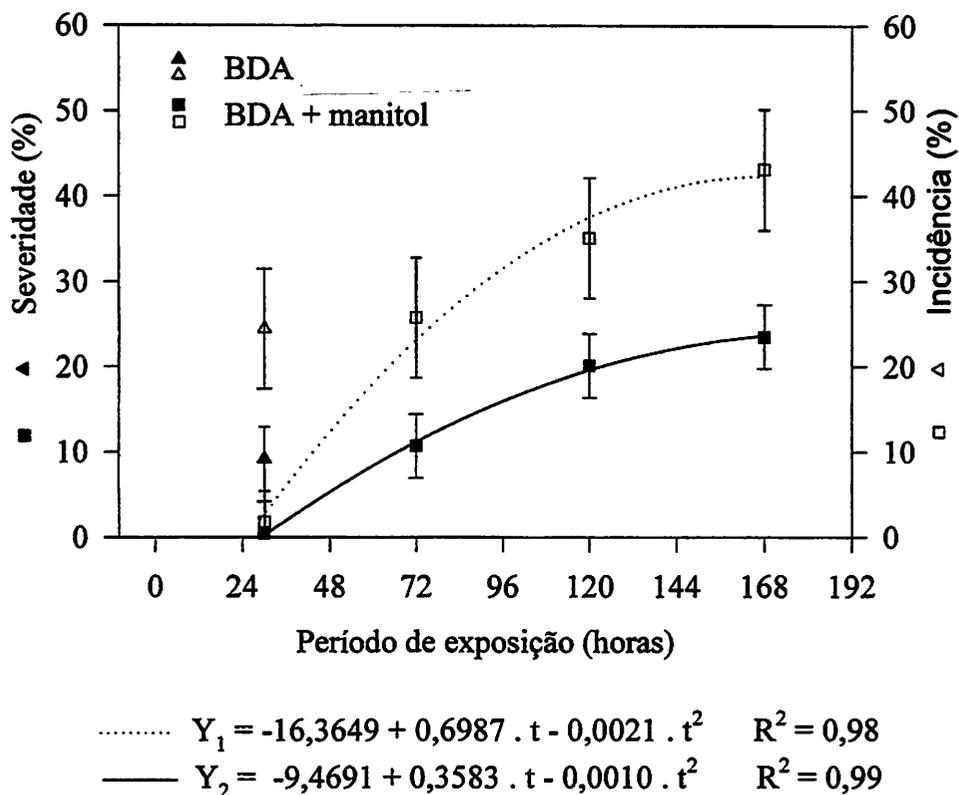


Figura 16 - Incidência média de plântulas infectadas (Y_1) e severidade média dos sintomas de antracnose (Y_2), determinadas pela emergência das plântulas em solo / areia, em função de diferentes períodos de exposição das sementes a *C.lindemuthianum* em BDA + manitol (t) e em BDA por 30 horas (testemunha). As barras na vertical representam o erro padrão. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Não foi observado correlação significativa entre os resultados do teste de sanidade das sementes com tegumento e a emergência de plântulas solo/areia. Entretanto, as correlações negativas e significativas entre a porcentagem de emergência de plântulas, e os parâmetros de incidência de plântulas infectadas e de severidade dos sintomas de antracnose, observados pela análise sanitária das sementes sem o tegumento, revelam que a interferência de *C. lindemuthianum* na redução da emergência das plântulas, depende da localização do inóculo nos tecidos da semente, sendo mais pronunciada quando este se localiza nos tecidos internos ao tegumento das sementes.

5. CONCLUSÕES

- O uso da restrição hídrica do BDA com manitol, constitui uma técnica viável para aumentar a eficiência do processo de inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro;
- O grau de associação de *Colletotrichum lindemuthianum* com as sementes de feijoeiro inoculadas pela técnica do BDA com manitol, aumenta a medida que o período de exposição das sementes ao inóculo do fungo é aumentado;
- A emissão de radículas de sementes de feijoeiro, acumulada em função do tempo de incubação destas sobre BDA, diminui à medida que o potencial hídrico do BDA é reduzido, tanto pela adição de manitol quanto pela adição de PEG 6.000, e inibe completamente a emissão de radículas na restrição hídrica de -1 MPa ;
- A exposição de sementes de feijoeiro durante 168 horas, sobre BDA + PEG 6.000, à restrição hídrica de -1MPa, causa maiores prejuízos à germinação das sementes do que em BDA + manitol, na mesma restrição hídrica e pelo mesmo período de tempo;
- O aumento da restrição hídrica do BDA com PEG 6.000, afeta negativamente o crescimento radial de colônias de *Colletotrichum lindemuthianum*;

- O aumento da restrição hídrica do BDA com manitol, estimula o crescimento radial de colônias de *Colletotrichum lindemuthianum* até a restrição hídrica de -0,8 MPa;
- O pré-condicionamento das sementes sobre BDA + manitol pelo período de 168 horas causa prejuízo à germinação das sementes.

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O desenvolvimento de metodologias confiáveis para inocular patógenos em sementes, é de grande utilidade em estudos envolvendo este tipo de interação. Os métodos tradicionais utilizados para a obtenção de sementes infectadas, nem sempre são viáveis, quer pelo período de tempo que demandam, ou mesmo por serem ineficientes ou questionáveis em evidenciar os efeitos do patógeno nas sementes inoculadas ou na progênie resultante.

Os resultados do presente trabalho indicam que o uso da restrição hídrica do substrato agarizado, para inibir a germinação de sementes de feijoeiro e prolongar o período de exposição destas com colônias de *Colletotrichum lindemuthianum* em desenvolvimento, constitui uma técnica eficaz e viável para aumentar a eficiência do processo de inoculação das sementes pelo referido patógeno. Entretanto, a infecção das sementes de feijoeiro pelo contato com colônias de *C. lindemuthianum* em desenvolvimento, em meio agarizado, pode estar relacionada ao equilíbrio entre o potencial hídrico do substrato fúngico e dos tecidos da semente, alcançado mais precocemente em BDA (testemunha) e, mais tardiamente, em BDA com manitol. Neste aspecto, o uso de restrições hídricas do BDA com manitol, inferiores a -1 MPa, por menores períodos de exposição das sementes ao patógeno, é um questionamento a ser considerado em outros estudos, podendo ser também uma medida efetiva para a obtenção de sementes de feijoeiro infectadas por diferentes patógenos.

É necessário considerar também que, a eficiência do método de inoculação estudado, pode apresentar diferentes resultados em função da variedade das sementes a serem utilizadas, ou mesmo da qualidade inicial do lote em estudo. Como as sementes utilizadas neste trabalho foram selecionadas, não sendo feito nenhum procedimento de assepsia superficial das mesmas, o

processo de infecção das sementes por *C. lindemuthianum* pode Ter sido influenciado pelo alto vigor inicial das sementes ou mesmo pela ação antagônica de fungos como *Fusarium* e, principalmente, *Cladosporium cladosporioides*, detectados em altos níveis no lote estudado.

Finalmente, devido à diversidade das respostas fúngicas ao estresse hídrico induzido, em diferentes substratos, o uso de outros meios de ccultura, bem como de outros solutos, como por exemplo, polietileno glicol, sais, açúcares e antibióticos, também constituem alternativas a serem consideradas em outros estudos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBAYO, A. A.; HARRIS, R. F. Fungal Growth responses to osmotic as compared to matric water potential. **Soil Science America Proceedings**, Madison, v. 35, n. 3, p. 465 - 469, May-June 1971.

AGARWAL, V. K.; SINCLAIR, J. B. Principles of seed pathology. Boca Raton: CRC Press, 1987. v. 2, 168 p.

ALAM, S.; JOYCE, D.; WEARYNG, A. Effects of equilibrium relative humidity on in vitro growth of *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, East Melbourne, v. 36, n. 3, p. 383 - 388, 1996.

ARAÚJO, E. Resistência do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) à infecção causada *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Et Magn.) Scrib. e à sua transmissão pelas sementes. Viçosa: UFV, 1988. 114p. (Tese - Doutorado em Fitopatologia).

BABADOOST, M.; DERIE, M. L.; GABRIELSON, R. L. Efficacy of sodium hypochlorite treatments for control of *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* in brassica seeds. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 24, n. 1, p. 7 - 15, 1996

BARROS, A. S. R. Maturação e Colheita de sementes. In: MARCOS FILHO, J., CICERO, S. M. (Org.). **Atualização em produção de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1986. p. 107 - 134.

- BASTOS, A; PORTO, M. P. M. Efeito da época de inoculação e da concentração de inóculo na transmissão de *Colletotrichum lindemuthianum* pelas sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 7, n. 3, p. 468, out. 1982 (Resumos).
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. Ed., New York: Plenum Press, 1994. 445 p.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: KIMAT, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A. et al.(eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, cap. 34, p. 376 - 399.
- BRACCINI, A. de L. **Relação entre potencial hídrico, condicionamento osmótico e qualidade fisiológica de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Viçosa: UFV, 1996. 135 p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).
- BRADFORD, K. J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. **Hortscience**, Alexandria, v. 21, n. 5, p. 1105 - 1112, Oct. 1986.
- BRADFORD, K. J. Water relations in seed germination. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (eds.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. Cap. 13, p.. 351 - 396.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365 p.

BROWNELL, K. H.; SCHNEIDER, R. W. Roles of matric and osmotic components of water potential and their interaction with temperature in the growth of *Fusarium oxysporum* in synthetic media and soil. *Phytopathology*: St Paul, v.75, n. 1, p. 53 - 57, Jan. 1985.

CARVALHO, H. P. de. **Aspéctos Patológicos e fisiológicos de sementes ou feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizadas na região sul do estado de Minas Gerais.** Lavras: ESAL, 1989. 97p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia).

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

CHAVES, G. La antracnosis. In: SCHWARTE, H. F.; GÁLVEZ, G. E. (eds). **Problemas de producion del frijoe: enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas, de *Phaseolus vulgaris*.** Cali: CIAT, 1980. p. 37 - 53.

COOK, J. R.; PAPENDICK, R. I. Role of water potential in microbial growth and development of plant disease, with special reference to postharvest pathology. *Hort Science*, Alexandria, v.13, n.5, p. 559 - 564, Oct. 1978.

COOK, R. J.; PAPENDICK, R. I. Influence of Water potential of soils and 3555 plants on roost disease. In: BAKER, K. F.; ZENTMYER, G. A.; COULING, E. B. (eds.). **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 10, p. 349 - 374, 1972.

CORDOBA, G. A. T.; LIMA e BORGES, E. E.; BORGES, R. de C.; NEVES, J. C. L. Osmocondicionamento de sementes de *Esebeckia leiocarpa* Engl. (guaratã). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 17, n.2, p. 217 – 226, 1995.

COSTA, A. S. Infestação de sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossypii* South e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Jornal da Agronomia**, Piracicaba, v. 2, p. 265 - 272, 1939.

DEL GIÚDICE, M. P. Condicionamento osmótico de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Vçosa: UFV, 1996. 130 p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).

DONI FILHO, L. Efeito do condicionamento fisiológico no comportamento de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Piracicaba: ESALQ 1992. 108 p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).

DUNIWAY, J. M. Water relations of water molds. In: GROGAN, R.G.; ZENTMYER, G. A.; COULING, E. B. (eds.). **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 17, p. 431 - 460. 1979.

EIRA, M. T. S. da. Condicionamento osmótico de sementes de alface (*Latuca sativa* L.): efeitos sobre a germinação e desempenho sob estresses hídrico, salino e térmico. Piracicaba: ESALQ, 1988. 90p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia)

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

GUIMARÃES, R. M. Efeito do condicionamento osmótico sobre a germinação e desempenho de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) sob condições ideais e de estresse térmico, hídrico e salino. Lavras: ESAL, 1991. 78p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).

HALL, R; Mac HARDY, W. E. Water relations In: MACE, M. E.; BEU, A. A.; BECKMAN, C. H. (eds.). **Fungal wilt diseases of plants** New York: Academic Press, 1981. cap. 8, p. 225 - 298.

X HEYDECKER, W. ; HIGGINS, J.; TURNER, Y. J. Invigoration of seeds? **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 3, p. 881 - 888, 1975.

HOBBS, P. R.; OBENDORF, R. L. Interaction of initial seed moisture and imbibitional temperature on germination and productivity of soybean. **Crop Science**, Madison, v. 12, p. 664 - 667, Sept./ Oct. 1972.

IOANNOU, N.; SCHNEIDER, R. G.; GROGAN; R. G.; DUNIWAY, J. M. Effect of water potential on growth, sporulation and production of microsclerotia by *Verticillium dahliae*. **Phitopathology**, St. Paul v. 67, n. 5, p. 637 - 644, May 1977.

ISTA (International Seed Testing Association), Seed Health Testing, **Seed Science and Technology**, Zürich, v.4, n. 1, p.152 - 155, 1976.

JUNQUEIRA, N. T. V.; CHAVES, G. M.; ZAMBOLIN, L.; ROMEIRO, R. da S.; GASPAROTTO, L. Isolamento, cultivo e esporulação de *Mycrocylus uley*, agente etiológico do mal das folhas da seringueira. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 31, n. 177, p. 322 - 331, set. 1984.

KIMATI, H. Doenças do feijoeiro – *Phaseolus vulgaris* L. In: GALLI, F. (Ed.). **Manual de Fitopatologia das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. v. 2, p. 297 - 318.

KANTAR, F.; HEBBLETHWIT, P. D.; PILBEAM, C. J. Factors influencing disease resistance in high and low tannin *Vicia faba*. **Journal Agricultural Science Cambridge**, v. 127, n. 1, p. 83 - 88, Aug. 1996.

LIMA, E. F.; CARVALHO, J. M. F. C.; CARVALHO, L. P. de; COSTA, J. N. da. Transporte e transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *Cephalosporioides*, através da semente do algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 10, n. 1, p. 105 - 115, fev. 1985.

X LUCCA FILHO, O. A. Importância da sanidade na produção de sementes de alta qualidade. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 7, n. 1, p. 113 - 123, 1985.

X MACHADO J. da C. Padrões de tolerância de patógenos associados à sementes. In: Luz, W. C. (ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v. 2, p. 239 - 236. 1994.

MACHADO, J. da C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília: Ministério da Educação, ESAL: FAEPE, 1988. 107 p.

MACHADO, J da C.; CARVALHO, M. G. de. Comportamento de cultivares comerciais de soja diante de isolamentos de *Colletotrichum truncatum* e transmissão do patógeno pelas sementes em função da época de infecção da planta. *Experientiae*, Viçosa, v. 19, n. 7, p.119 -148, abr., 1975.

McKINEY, H. H. Influence of soil temperature of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helmitosporium sativum* Journal Agricultural Research, Washington, v. 26, n. 5, p. 195 – 219, nov., 1923.

MAFFIA, L. A.; CARMO, M. G. F.; KATSURAYAMA, Y. Epidemiologia e controle das principais doenças do feijoeiro. In: SEMINARIO SOBRE PRAGAS E DOENÇAS DO FEIJOEIRO, 3., 1998. Piracicaba. *Anais...* Campinas: IAC, 1998. p. 103 - 126.

MAGALHÃES, C. M.; CORELLI, M. L. Germinação de sementes de feijão (*Phseolus vulgaris* L.) sob condições variadas de pressão osmótica. *Bragantia*, Campinas, v. 31, p. XIX - XXVI, jan. 1972. nota 5.

MATHUR, R. S.; BARNETT, H. L.; LILLY, V. G. Sporulation of *Colletotrichum lindemuthianum* in culture. *Phytopathology*, St. Paul, v. 40, n. 1, p. 104 - 114, Jan. 1950.

MAYER, A. M; POL JAKOFF - MAYBER, A. **The germination of seeds.** Oxford: Pergamon Press, 1989. 270 p.

MENEZES, J. R. de. Manejo integrado das doenças do feijoeiro irrigado. In: SEMINARIO SOBRE PRAGAS E DOENÇAS E PLANTAS DANINHAS DO FEJJOEIRO 5., 1994, Piracicaba. **Anais...** Campinas: ESALQ, 1994. p. 112 - 122.

MENEZES, J. R. Diagnóstico da patologia de sementes de feijão no Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 7, n. 1, p. 49 - 53, 1985.

MENEZES, J. R. MOHAN, S. K. Comparação dos métodos de papel de filtro ("Blotter test") e o rolo de papel toalha para análise da qualidade sanitária de sementes de feijoeiro, (*Phaseolus vulgaris L.*) In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEJJOEIRO 1., 1982, Goiânia. **Anais...** Goiânia: EMBRAPA - CNPAF, 1982 a. p. 340 - 342.

MENEZES, J. R. MOHAN, S. K. Efeito da seleção visual da semente de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris L.*) sobre a qualidade sanitária In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEJJOEIRO 1., 1982, Goiânia. **Anais...** Goiânia: EMBRAPA - CNPAF, 1982 b. p. 343 - 345.

MENTEM, J. O. M. Importância da semente na transmissão de patógenos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 2., 1986, Campinas. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1986. p. 27 - 40.

MENTEN, J. O. M. Sanidade, germinação e vigor de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). **Summa Phytopathologica**, Taguariuna, v. 4, n. 2 / 4, p. 105 - 110, abr. - dez. 1978.

MENTEN, J. O. M. **Semana de Atualização em Patologia de Sementes**, 1. Piracicaba: FEALQ/ ESALQ, 1988. 76 p.

MEXAL, J.; REID, C. P. P. The growth of selected mycorrhizal fungi in response to induced water stress. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 51, n. 9, p. 1579 - 1588, Sept. 1973.

MEXAL, J.; FISCHER, J. T.; OSTERYOUNG, J.; REID, C. P. P. Oxigen availability in polyethylene glycol solutions and its implications in plant water relations. **Plant physiology**, Rockville, v. 55, n. 1, p. 20 – 24, Jan. 1975.

MICHEL, B. E. Evaluation of the Water Potentials of solutions of polyethylene glycol 8000 both in the absence and presence of other solutes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 72, n. 1, p. 66 - 70, May. 1983.

MICHEL, B. E. KAUFMANN, M. R. The osmotic potential of polyethylene glycol 6.000. **Plant Physiology**, Rockville, v. 51, n. 5, p. 914 - 916, May. 1973.

MORLEY, T. B.; WILLIAMS, B. L.; PRICE, T. V. The effects of water stress on the incidence and severity of paspalum leaf blight and on *Ascochyta paspali*. **Australian Plant Pathology**, v. 22, n. 3, p. 105 - 110, 1993.

NEEGAARD, P. **Seed pathology**. London: MacMillan Press, 1979. 839 p.

NELDER, J. A.; WEDDERBURN, W. M. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statical Socieity**. v. 135, n. 3, p. 370 – 384, 1972.

- OLIVEIRA, S. M.A. de. **Transmissão de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magn.) Scribner por sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e seu controle através do tratamento químico e biológico.** Piracicaba: ESALQ, 1991. 72p. (Tese - Doutorado em Fitopatologia)
- PATRÍCIO, F. R.A.; BORIN, R.B.R.G.; ORTOLANI, D.B. Patógenos associados a semente que reduzem a germinação e o vigor. In: MENTEM, J.O.M. (eds.). **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico.** Piracicaba: ESALQ. 1991. Cap. 3, p. 137 - 160.
- PERES, A. P. **Detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e soja (*Glicine max* (L.)Merril): Desenvolvimento de metodologias.** Lavras : UFLA, 1996. 51p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia).
- PILL, W. G. Low Water potential and pressing germination treatments to improve seed quality. In: BARSA, A. S. (ed.) **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications.** New York: Food Products Press, 1994. p. 319 - 359.
- PIZZINATTO, M. A.; CIA, E.; FUZATTO, M. G. Relação entre severidade da ramulose do algodoeiro em condições de campo e a presença de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* nas sementes produzidas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 1, mar. 1994, p. 50-54.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente.** Brasília, AGIPLAN, 1977. 289 p.

PRISCO, J. T.; O' LEARY, J. W. Osmotic and "toxic:" effects of salinity on germination of *Phaseolus vulgaris* L. seeds. **Turrialba**, San José, v.20, n. 2, p. 177 - 184, Abr.- Jun., 1970.

RAVA, A. C.; SARTORATO, A. Eficiência de fungicidas no controle de *Colletotrichum lindemuthianum* inoculado em sementes de feijoeiro. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJOEIRO, 5., Goiânia, 1996. **Anais...** Goiânia: EMBRAPA - CNPAF, 1996. p. 210 - 212.

X RAVA, C. A.; VIEIRA, E. H. N.; COSTA, J. G. C.; SILVEIRA, P. M. Obtenção de germoplasma de feijoeiro livre de patógenos transmissíveis pela semente. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 3, n. 3, p. 135 - 146, 1981.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology**. 4 ed., Belmont, Wadsworth, 1991. 682 p.

SAS Institute Inc. SAS technical report SAS / STAT software: changes and enhancement relase 607, Cary Nc: SAS Institute Inc., 1992.

SENARATNA, T.; MCKERSIE, B. D. Dehydration injury in germinating soybean (*Glycine max.* L. Merr.) seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 72, n. 3, p. 620 - 624, July, 1983.

SHIOGA, P. S. **Controle da hidratação e desempenho das sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Piracicaba: ESALQ, 1990. 106 p. (Tese - Mestrado em Fitotecnia).

- SILVA, M. A. D. da. **Envelhecimento artificial: comportamento fisiológico das sementes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e suas relações com a presença de microrganismos.** Piracicaba: ESALQ, 1997. 61p. (Tese - Mestrado em Fitotecnia).
- STEUTER, A. A.; MOZAFAR, A.; GOODIN, J. R. Water potential of aqueous polyethylene glycol. **Plant Physiology**, Rockville, v. 67, n. 1, p. 64 - 67, Jan. 1981.
- SUBBARAO, K. V.; MICHAILIDES, T. J.; MORGAN, D. P. Effects of osmotic potential and temperature on growth of two pathogens of figs and a biocontrol agent. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 12, p.1454 - 1459, Dec. 1993.
- TANAKA, M. A. S. **Patogenicidade e transmissão por sementes do agente causal da ramulose do algodoeiro.** Piracicaba: ESALQ, 1990, 111 p. (Tese - Doutorado em Fitopatologia).
- TANAKA, M. A. S.; MENTEM, J. O. M. Relação entre a resistência do algodoeiro à ramulose e a transmissão de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* pelas sementes. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.18, n. 3 / 4, p. 227 - 234, Jul. / Dez.,1992.
- TANAKA, M. A. S.; MENTEN, J. O. M.; MARIANO, M. I. A. Inoculação artificial de sementes de algodão com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e infecção das sementes em função do tempo de exposição ao patógeno. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 15, p. 232 - 237, jul. - dez. 1989.

- TANAKA, M. A. S; CORRÊA M. U. Influência de *Aspergillus* e *Penicillium* no armazenamento de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 3, p. 451 - 456, out. 1981.
- TANAKA, M. A. S; MACHADO, J. C. Patologia de Sementes. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v. 11, n. 122, p. 40 - 46, fev. 1985.
- THOMAS, J. C.; SEPAHI, M.; ARENDALL, B.; BOHNERT, H.T. Enhancement of seed germination in high salinity by engineering mannitol expression in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v.18, n. 7, p. 801 - 806, July, 1995.
- TOLEDO, F. F.; MARCOS FILHO, J. **Manual das sementes: Tecnologia da produção**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1977. 224 p.
- TU, J. C. *Colletotrichum lidemuthianum* on bean: population dynamics of the pathogen and breeding for resistance. In: BAILEY, M. J.; JEGER, M. J. (eds.) *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. Melkshan : BSPP, 1992, Cap. 10, p. 203 - 249.
- VASQUEZ, G. H. **Condicionamento fisiológico de sementes de soja: efeitos sobre a germinação vigor e potencial de armazenamento**. Piracicaba: ESALQ, 1995. 138 p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- VERTUCCI, C. W; LEOPOLD, A. C. Dynamics of imbibition of soybean embryos. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 72, n. 1, p. 190 - 193, May. 1983.

VIEIRA, M. G. G. C. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento do nível de deterioração e da qualidade sanitária de sementes do algodoeiro.** Lavras: UFLA. 1996, 118 p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).

VIEIRA. M. G. A. C. Aspectos da interação tecnologia e sanidade em estudos de sementes . SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 3., 1988, Lavras. **Anais...** Lavras: ESAL, 1988. p. 48 - 57.

WEARING, A. H.; BURGESS, L. W. Water potential and the saprophytic growth of *Fusarium roseum* "graminearum". **Soil Biology Biochemisry**, Oxford, v. 11, p.661 - 667, 1979.

8. ANEXO

	Página
Tabela 1A Resumo da análise de “deviância” dos dados referentes à porcentagem acumulada de emissão radículas de sementes de feijoeiro.....	91
Tabela 2A 2A Estimativas de parâmetros lineares utilizados no ajuste dos modelos de porcentagem acumulada de emissão de radículas de sementes de feijoeiro.....	91
Tabela 3A Resumo da análise de variância dos dados referentes à porcentagem de germinação, após o pré-condicionamento destas por 168 horas, em BDA + PEG 6.000 e em BDA + manitol	92
Tabela 4A Resumo da análise de variância dos dados referentes à porcentagem de sementes mortas, após o pré-condicionamento destas por 168 horas, em BDA + PEG 6.000 e em BDA + manitol.....	92
Tabela 5A Resumo da análise de variância dos dados referentes ao diâmetro radial das colônias de <i>C. lindemuthuanum</i>	93
Tabela 6A Resumo da análise de regressão dos dados referentes ao diâmetro radial das colônias de <i>C. lindemuthuanum</i>	93
Tabela 7A Resumo da análise de variância dos dados referentes ao grau de umidade atingido pelas sementes após cada tratamento	94
Tabela 8A Resumo da análise de variância dos dados referentes ao grau de umidade das sementes após a secagem	94

Tabela 9A	Resumo das análises de variância dos dados referentes à severidade e à incidência de antracnose durante a avaliação do teste de sanidade das sementes com o tegumento	95
Tabela 10A	Resumo das análises de variância dos dados referentes à severidade e à incidência de antracnose durante a avaliação do teste de sanidade das sementes sem o tegumento.....	95
Tabela 11A	Coefficientes de correlação entre os diferentes parâmetros avaliados na terceira etapa experimental.....	96
Tabela 12A	Resumo da análise de variância dos dados referentes à porcentagem de germinação das sementes em condições de laboratório.....	97
Tabela 13A	Resumo das análises de variância dos dados referentes à severidade e à incidência de antracnose durante a avaliação da germinação das sementes em condições de laboratório	97
Tabela 14A	Resumo da análise de variância dos dados referentes à porcentagem de emergência de plântulas em solo / areia.....	98
Tabela 15 A	Resumo das análises de variância dos dados referentes à severidade e á incidência de antracnose aos nove dias após o semeio das sementes em solo / areia.....	98

TABELA 1A Resumo da análise de “deviância” dos dados referentes à porcentagem acumulada de emissão radículas de sementes de feijoeiro, em função da restrição hídrica, do tipo de substrato, do pré-tratamento de assepsia e do período de exposição das sementes (tempo). UFLA, Lavras - MG, 1999.

Fonte de variação	g.l.	Deviância	X ²	P > X ²
Intercepto	0	3502,4190	-	0,0001
Substrato	2	2091,4937	1410,9254	0,0001
Assepsia	1	2088,4480	3,0045	0,0810
Restrição hídrica	1	1679,5399	408,9081	0,0001
Tempo	1	221,7640	1457,7759	0,0001
(Tempo) ²	1	206,8928	14,1379	0,0001
R.hídrica x substrato	1	165,7549	41,1379	0,0001
Tempo x substrato	2	154,7443	11,0106	0,0041

TABELA 2A Estimativas de parâmetros lineares utilizados no ajuste dos modelos de porcentagem acumulada de emissão de radículas de sementes de feijoeiro, em função da restrição hídrica, do tipo de substrato, do pré-tratamento de assepsia e do período de exposição das sementes (tempo). UFLA, Lavras - MG, 1999.

Parâmetro	g.l.	Estimativa	Erro padrão	X ²	Pr > X ²
Intercepto	1	-21,8800	3,3714	42,1194	0,0001
BDA+manitol	1	5,0067	1,9702	6,4443	0,0111
Testemunha	1	8,3368	2,0529	16,4911	0,0001
Com assepsia	1	-0,2833	0,1194	5,6284	0,0177
Restrição hídrica	1	-5,1141	0,6288	66,1512	0,0001
Tempo	1	0,2295	0,0404	32,2132	0,0001
(Tempo) ²	1	-0,0006	0,0001	18,6067	0,0001
R. hídrica x BDA+manitol	1	-7,1609	1,1835	36,6101	0,0001
Tempo x BDA+manitol	1	-0,0054	0,0121	0,1998	0,6549
Tempo x testemunha	1	-0,0362	0,0123	7,4207	0,0064

TABELA 3A Resumo da análise de variância dos dados referentes à porcentagem de germinação de sementes de feijoeiro, em função do pré-tratamento de assepsia superficial e do pré-condicionamento destas por 168 horas em BDA + PEG 6.000 e BDA + manitol (substrato), à restrição hídrica de -1 MPa, e sobre BDA + manitol, à restrição hídrica de de -0,8 MPa (adicinais). UFLA, Lavras - MG, 1999.

Fonte de variação	g.l.	Quadrados médios	P > F
Tratamentos	5	270,400	0,0011
Assepsia	1	529,000	0,0020
Substrato	1	289,000	0,0159
Assepsia x substrato	1	169,000	0,0570
Fatorial vs. adicionais	1	363,000	0,0080
Resíduo	18	40,888	
C.V.	6.87		

TABELA 4A Resumo da análise de variância dos dados referentes à porcentagem de sementes mortas, em função do pré-tratamento de assepsia superficial e do pré-condicionamento destas por 168 horas, em BDA + PEG 6.000 e BDA + manitol (substrato), à restrição hídrica de -1 MPa, e sobre BDA + manitol, à restrição hídrica de de -0,8 MPa (adicinais). UFLA, Lavras - MG, 1999.

Fonte de variação	g.l.	Quadrados médios	P > F
Tratamentos	5	2,879	0,0001
Assepsia	1	3,124	0,0008
Substrato	1	6,113	0,0001
Assepsia x substrato	1	3,124	0,0008
Fatorial vs. adicionais	1	2,037	0,0045
Resíduo	18	0,194	
C.V.	39,34		

TABELA 5A Resumo da análise de variância dos dados referentes ao diâmetro radial das colônias de *C. lindemuthuanum*, aos oito dias de incubação em BDA (testemunha), e em BDA modificado pela adição de PEG 6.000 ou manitol (substrato), em 4 níveis de restrição hídrica. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Fonte de variação	g.l.	Quadrados médios	Pr > F
Tratamentos	8	2,5981	0,0001
Substrato	1	17,6890	0,0001
Restrição hídrica	3	0,6277	0,0001
Substrato x restrição hídrica	3	0,1398	0,0001
Fatorial vs. testemunha	1	0,7933	0,0001
Resíduo	36	0,0101	
C.V.	1,86		

TABELA 6A Resumo da análise de regressão dos dados referentes ao diâmetro radial das colônias de *C. lindemuthuanum*, aos oito dias de incubação em BDA (testemunha), e em BDA modificado pela adição de PEG 6.000 ou manitol (substrato), em 4 níveis de restrição hídrica. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Fonte de variação	g.l.	Quadrados médios	P > F
Tratamentos	4	5,1842	0,0001
Resíduo	40	0,0103	
C.V.	1,88		

Parâmetro	Estimativa	Erro padrão	P > T
Intercepto	5,0256	0,0441	0,0001
X_p (BDA + PEG)	0,6715	0,1925	0,0012
X_p^2 (BDA + PEG)	-1,3149	0,1870	0,0001
X_m (BDA + manitol)	4,1774	0,1925	0,0001
X_m^2 (BDA + manitol)	-3,3879	0,1870	0,0001
R^2	0,98		

TABELA 7A Resumo da análise de variância dos dados referentes ao grau de umidade atingido pelas sementes em função de diferentes períodos de exposição destas a BDA + manitol (tempo), e a BDA por 30 horas (testemunha), em duas modalidades (inoculação e controle) e em relação as sementes não embebidas. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Fonte de variação	g.l.	Quadrados médios	P > F
Tratamentos	10	277,000	0,0001
Modalidade	1	38,862	0,0001
Tempo	3	129,997	0,0001
Modalidade x tempo	3	0,436	0,4004
Fatorial vs. testemunha	1	40,996	0,0001
Test. Controle. vs. test. Inoculação	1	2,680	0,0199
Não embebida vs. demais	1	2296,220	0,0001
Resíduo	22	0,426	
C.V.	1,82		

TABELA 8A Resumo da análise de variância dos dados referentes ao grau de umidade das sementes após a secagem, em função de diferentes períodos de exposição destas a BDA + manitol (tempo), e a BDA por 30 horas (testemunha), em duas modalidades (inoculação e controle) e em relação as sementes não embebidas. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Fonte de variação	g.l.	Quadrados médios	P > F
Tratamentos	10	32,765	0,0001
Modalidade	1	94,287	0,0001
Tempo	3	2,348	0,1393
Modalidade x tempo	3	3,666	0,0447
Fatorial vs. testemunha	1	1,320	0,2972
Test. Controle. vs. test. inoculação	1	55,998	0,0001
Não embebida vs. demais	1	157,997	0,0001
Resíduo	22	1,158	
C.V.	6,72		

TABELA 9A Resumo das análises de variância dos dados referentes à severidade e à incidência de antracnose durante a avaliação do teste de sanidade das sementes com o tegumento, em função de diferentes períodos de exposição destas ao inóculo de *C. lindemuthianum*, em BDA + manitol (tempo), e em BDA por 30 horas (testemunha). UFLA, Lavras - MG, 1999.

Fonte de variação	g.l.	Incidência		Severidade	
		Quadrados médios	P > F	Quadrados médios	P > F
Tratamentos	4	146,566	0,0017	354,777	0,0032
Tempo	3	1456,555	0,0010	433,462	0,0022
Demais vs. testemunha	1	216,600	0,2036	118,722	0,1264
Resíduo	10	117,066		42,696	
C.V.		33,05		38,64	

TABELA 10A Resumo das análises de variância dos dados referentes à severidade e à incidência de antracnose durante a avaliação do teste de sanidade das sementes sem o tegumento, em função de diferentes períodos de exposição destas ao inóculo de *C. lindemuthianum*, em BDA + manitol (tempo), e em BDA por 30 horas (testemunha). UFLA, Lavras - MG, 1999.

Fonte de variação	g.l.	Incidência		Severidade	
		Quadrados médios	P > F	Quadrados médios	P > F
Tratamentos	4	416,733	0,0003	109,322	0,0010
Tempo	3	428,972	0,0004	117,915	0,0011
Demais vs. testemunha	1	380,016	0,0042	83,544	0,0148
Resíduo	10	27,866		9,658	
C.V.		50,75		9,65	

TABELA 11A Coeficientes de correlação entre os diferentes parâmetros avaliados na terceira etapa experimental: germinação (Germ.), emergência em em solo / areia (Emerg.), incidência de plântulas infectadas (Incid.), severidade dos sintomas de antracnose (Sever.), sanidade das sementes com tegumento (San.c.t.), sanidade das sementes sem tegumento (San.s.t.). UFLA, Lavras – MG, 1999.

Parâmetros	Incid. Emerg.	Incid. San. c.t.	Incid. San. s.t.	Sever. Germ.	Sever. Emerg.	Sever. San. c.t.	Sever. San. s.t.	Germ.	Emer.	G.U.1	G.U.2
Incid.Germ.	0,81**	0,95**	0,78**	0,98**	0,82**	0,95**	0,74**	-0,38*	-0,28*	0,44**	0,55**
Incid.Emerg.	-	0,80**	0,82**	0,78**	0,98**	0,77**	0,81**	-0,36*	-0,29	0,42*	0,58**
Incid. San.c.t.	-	-	0,66**	0,92**	0,77**	0,99**	0,61**	-0,31	-0,20	0,42*	0,62**
Incid. San.s.t.	-	-	-	0,80**	0,90**	0,64**	0,99**	-0,48**	-0,44**	0,39*	0,44*
Sever.Germ.	-	-	-	-	0,80**	0,93**	0,76**	-0,42**	-0,33	0,42*	0,51**
Sever.Emerg.	-	-	-	-	-	0,74**	0,89**	-0,41*	-0,35*	0,42*	0,54**
Sever. San.c.t.	-	-	-	-	-	-	0,60**	-0,33	-0,20	0,41*	0,60**
Sever.San.s.t.	-	-	-	-	-	-	-	-0,49**	-0,46**	0,37*	0,41*
Germinação	-	-	-	-	-	-	-	-	0,45**	-0,41**	-0,33
Emergência	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,21	-0,13
G.U.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,74**

* Significativo a 5% pelo teste de Student

**Significativo a 1% pelo teste de Student

TABELA 12A Resumo da análise de variância dos dados referentes à porcentagem de germinação das sementes, em função de diferentes períodos de exposição destas a BDA + manitol (tempo) e a BDA por 30 horas (testemunha), em duas modalidades (inoculação e controle), e em relação às sementes não embebidas. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Fonte de variação	g.l.	Quadrados médios	P > F
Tratamentos	10	3,800	0,0060
Modalidade	1	3,375	0,0882
Tempo	3	9,708	0,0004
Modalidade x tempo	3	0,486	0,7142
Não embebida vs. fatorial	1	3,375	0,0882
Não embebida vs. testemunha	1	2,000	0,1835
Fatorial vs. testemunha	1	0,075	0,7928
Resíduo	22	1,060	
C.V.	1,04		

TABELA 13A Resumo das análises de variância dos dados referentes à severidade e à incidência de antracnose durante a avaliação da germinação das sementes em laboratório, em função de diferentes períodos de exposição destas ao inóculo de *C. lindemuthianum*, em BDA + manitol (tempo), e em BDA por 30 horas (testemunha). UFLA, Lavras - MG, 1999.

Fonte de variação	g.l.	Incidência		Severidade	
		Quadrados médios	P > F	Quadrados médios	P > F
Tratamentos	4	1186,400	0,0008	277,796	0,0012
Tempo	3	1552,861	0,0004	360,217	0,0007
Demais vs. testemunha	1	84,016	0,3791	30,530	0,3036
Resíduo	10	99,200		25,960	
C.V.		84,01		44,22	

TABELA 14A Resumo da análise de variância dos dados referentes porcentagem de emergência de plântulas dos tratamentos de inoculação e controle (exposição), em função de diferentes períodos de exposição destas a BDA + manitol (tempo) e a BDA por 30 horas (testemunha), em duas modalidades (inoculação e controle), e em relação às sementes não embebidas. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Fonte de variação	g.l.	Quadrados médios	P > F
Bloco	2	2,718	0,7243
Tratamentos	10	18,188	0,0653
Modalidade	1	12,615	0,2316
Tempo	3	44,249	0,0072
Modalidade x tempo	3	3,869	0,7088
Não embebida vs. fatorial	1	0,689	0,7761
Não embebida vs. testemunha	1	0,888	0,7468
Fatorial vs. testemunha	1	0,120	0,9056
Resíduo	20	8,291	
C.V.	2,94		

TABELA 15A Resumo das análises de variância dos dados referentes a severidade e á incidência de antracnose, nove dias após a semeadura das sementes em solo/areia, em função de diferentes tempos de exposição destas ao inóculo de *C. lindemuthianum*, em BDA + manitol (tempo), e em BDA por 30 horas (testemunha). UFLA, Lavras - MG, 1999.

Fonte de variação	g.l.	Incidência		Severidade	
		Quadrados médios	P > F	Quadrados médios	P > F
Bloco	2	6,282	0,9590	6,482	0,8601
Tratamentos	4	723,733	0,0279	253,492	0,0156
Tempo	3	961,777	0,0158	321,548	0,0099
Demais vs. testemunha	1	9,600	0,8062	49,322	0,3111
Resíduo	8	149,379		42,200	
C.V.		46,94		50,91	