

**PODRIDÃO DE *FUSARIUM* EM PALMA DE
SANTA RITA (*Gladiolus x grandiflorus* L.):
IDENTIFICAÇÃO; VARIABILIDADE;
PATOGENICIDADE E OBTENÇÃO DE
PLÂNTULAS DE GLADIÓLOS A PARTIR
DE CULTURA DE MERISTEMAS**

ROSÂNGELA DA CONCEIÇÃO MARQUES PENA

1911

<

1911
1912
1913
1914
1915
1916
1917
1918
1919
1920
1921
1922
1923
1924
1925
1926
1927
1928
1929
1930
1931
1932
1933
1934
1935
1936
1937
1938
1939
1940
1941
1942
1943
1944
1945
1946
1947
1948
1949
1950
1951
1952
1953
1954
1955
1956
1957
1958
1959
1960
1961
1962
1963
1964
1965
1966
1967
1968
1969
1970
1971
1972
1973
1974
1975
1976
1977
1978
1979
1980
1981
1982
1983
1984
1985
1986
1987
1988
1989
1990
1991
1992
1993
1994
1995
1996
1997
1998
1999
2000
2001
2002
2003
2004
2005
2006
2007
2008
2009
2010
2011
2012
2013
2014
2015
2016
2017
2018
2019
2020
2021
2022
2023
2024
2025
2026
2027
2028
2029
2030
2031
2032
2033
2034
2035
2036
2037
2038
2039
2040
2041
2042
2043
2044
2045
2046
2047
2048
2049
2050
2051
2052
2053
2054
2055
2056
2057
2058
2059
2060
2061
2062
2063
2064
2065
2066
2067
2068
2069
2070
2071
2072
2073
2074
2075
2076
2077
2078
2079
2080
2081
2082
2083
2084
2085
2086
2087
2088
2089
2090
2091
2092
2093
2094
2095
2096
2097
2098
2099
2100

47658

225174FW

ROSÂNGELA DA CONCEIÇÃO MARQUES PENA

PODRIDÃO DE *FUSARIUM* EM PALMA DE SANTA RITA (*Gladiolus x grandiflorus* L.); IDENTIFICAÇÃO, VARIABILIDADE, PATOGENICIDADE E OBTENÇÃO DE PLÂNTULAS DE GLADIÓLOS A PARTIR DE CULTURA DE MERISTEMAS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Fitopatologia, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Mário Sobral de Abreu

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1999

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

Pena, Rosângela da Conceição Marques

Podridão de *Fusarium* em palma de Santa Rita (*Gladiolus x grandiflorus* L.)
; identificação, variabilidade, patogenicidade e obtenção de plântulas de gladiolos a
partir de cultura de meristemas / Rosângela da Conceição Marques Pena. --
Lavras : UFLA, 1999.

95 p. : il.

Orientador: Mário Sobral de Abreu.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Gladiolos. 2. *Fusarium*. 3. Identificação. 4. Variabilidade. 5.
Patogenicidade. 6. Cultura de meristema. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título:

CDD-635.97745

-632.4

ROSÂNGELA DA CONCEIÇÃO MARQUES PENA

PODRIDÃO DE *FUSARIUM* EM PALMA DE SANTA RITA (*Gladiolus x grandiflorus* L.): IDENTIFICAÇÃO, VARIABILIDADE, PATOGENICIDADE E OBTENÇÃO DE PLÂNTULAS DE GLADIÓLOS A PARTIR DE CULTURA DE MERÍSTEMAS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Fitopatologia, para a obtenção do título de "Mestre".


APROVADA em 30 de junho de 1999

Prof. Silvério José Coelho

UFLA

Sara Maria Chalfoun de Souza

EPAMIG


Prof. Mário Sobral de Abreu
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1999

OFEREÇO

**Aos meus pais, Guilherme Pena e Maria Pena, meu
irmão Fábio Pena, a minha avó Elda Venturieri (*in memoriam*) pelo
incansável apoio, carinho, confiança e compreensão a mim
dispensados**

**Aos meus familiares pelos
momentos de especial dedicação,
palavras de incentivo e carinho
inestimáveis**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente às pessoas e entidades que colaboraram para a realização deste trabalho e, de modo especial,

Prof. Mário Sobral de Abreu, pela valiosa orientação, amizade, dedicação, apoio e sugestões.

Prof. Silvério José Coelho e Prof. Patrícia de Oliveira Paiva, pela co-orientação, incentivo e sugestões prestados em todas as etapas do trabalho.

À Faculdade de Ciências Agrárias do Pará (FCAP), pela oportunidade concedida para a realização do trabalho.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade e amizade.

A SDW Flower Bulbs, Agrícola Schoenmaker de Wit, pelo fornecimento de material vegetal utilizados neste trabalho.

A pesquisadora Sarah Maria Chalfoun de Souza, pelas contribuições fornecidas com a sua participação na banca examinadora.

Ao Prof. Moacir Pasqual e sua equipe de trabalho do Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras, pela contribuição, especialmente Vantuil e Claret, pela dedicação e colaboração.

Ao Jailson, Dona Marta, Seu João, Almir, Giovanni e Marina, pelo carinho, hospitalidade, amizade, compreensão e paciência dispensada.

A minha eterna gratidão à Jurema, Fernando, Fernandinha, Dona Dina e Felipe, pela maneira carinhosa com que me acolheram em sua casa.

A Wirton, Flávio, Liliana, Luiza, Eneida, Riña, Dênmore, pela ajuda, estímulo e sugestões.

A turma do cafezinho Valéria, Pedro Henrique, Raimundo e Luiza pela grande amizade.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO	03
2.1 Aspectos botânicos do gladiolo.....	03
2.2 Aspectos culturais, econômicos e fitossanitários da cultura.....	04
2.3 Etiologia e histórico da fusariose em gladiolo.....	05
2.4 Sintomatologia.....	08
2.5 Patogênese e Epidemiologia.....	11
2.6 Caracterização de <i>Fusarium</i> sp.....	13
2.7 Variabilidade e resistência à <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>gladioli</i> (Massey) Synder e Hansen.....	16
2.8 Aplicações da cultura de tecidos vegetais na fitopatologia.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Análise fitossanitária dos bulbos, obtenção dos isolados, preparo do inóculo, obtenção das culturas e identificação das espécies.....	23
3.1.1 Determinação da incidência de <i>Fusarium</i> sp. em amostras de bulbos de gladiolo.....	23
3.1.2 Isolados de <i>Fusarium</i> sp. utilizados.....	24
3.1.3 Preparo de inóculo.....	25
3.1.4 Obtenção das culturas.....	26
3.1.5 Identificação das espécies.....	26
3.1.5.1 Morfologia dos conídios e clamidósporos.....	26
3.1.5.2 Índice de crescimento micelial de <i>Fusarium</i> sp. (ICM).....	27
3.1.5.3 Descrição das colônias.....	28
3.1.5.4 Comprimento das fíalides e formação dos conídios.....	28

3.2. Estudo de variabilidade e patogenicidade de <i>Fusarium</i> sp. em gladiolo.....	28
3.2.1 Inoculação com discos de micélio no corno para teste de variabilidade.....	30
3.2.2 Inoculação com ferimentos no corno para teste de patogenicidade.....	31
3.2.3 Métodos de inoculação <i>in vitro</i>	32
3.3 Estabelecimento <i>in vitro</i> de gladiolo utilizando meristema.....	33
3.3.1 Limpeza e desinfestação do material.....	33
3.3.2 Extração dos meristemas e condições de incubação.....	34
3.3.3 Preparo do meio de cultivo para meristema.....	34
3.3.4 Subcultivo do material	35
3.3.5 Análise fitopatológica do material <i>in vitro</i>	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1 Análise fitossanitária dos bulbos, obtenção dos isolados, preparo do inóculo e identificação das espécies.....	37
4.1.1 Incidência de <i>Fusarium</i> sp. e outros patógenos sobre bulbos de gladiolo.....	37
4.1.2 Identificação das espécies de <i>Fusarium</i> sp. isolados de bulbos de gladiolo.....	39
4.1.2.1 Morfologia de conídios.....	39
4.1.2.2 Crescimento radial do micélio.....	42
4.1.2.3 Morfologia das colônias de <i>Fusarium</i> sp.....	43
4.1.2.4 Dimensões de clamidósporos e fíalides.....	44
4.2 Estudo de variabilidade e patogenicidade de <i>Fusarium</i> sp. em gladiolo.....	46
4.2.1 Teste de variabilidade.....	46
4.2.2 Teste de patogenicidade.....	48
4.2.3 Avaliação de metodologias de inoculação <i>in vitro</i>	51
4.3 Estabelecimento <i>in vitro</i> de gladiolo a partir de cultura de meristemas.....	55
4.3.1 Tratamento de bulbos de gladiolo.....	55

4.3.2 Efeito dos reguladores de crescimento BAP, cinetina e ANA sobre o estabelecimento <i>in vitro</i> de gemas apicais de gladiolo.....	55
4.3.3 Efeito dos reguladores de crescimento BAP e cinetina sobre a multiplicação <i>in vitro</i> de gemas apicais de gladiolo, var. White Friendship.....	56
4.3.4 Efeito dos reguladores de crescimento BAP e cinetina sobre o enraizamento de explantes de gladiolo, var. White Friendship.....	60
4.3.5 Análise da sanidade das plântulas micropropagadas.....	63
5 CONCLUSÕES.....	65
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
ANEXOS.....	80

RESUMO

PENA, Rosângela da Conceição Marques. Podridão de *Fusarium* em Palma de Santa Rita (*Gladiolus x grandiflorus* L.): identificação, variabilidade, patogenicidade e obtenção de plântulas de gladiolo a partir de cultura de meristemas. Lavras: UFLA, 1999. 95p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia)

Com o intuito de se obter um melhor conhecimento da ocorrência de fusariose em gladiolo, afim de evitar maiores perdas para o mercado de flores, o presente trabalho teve como objetivos avaliar a incidência de *Fusarium* sp. em bulbos de cultivares comerciais; caracterizar e verificar a variabilidade e patogenicidade dos isolados; estabelecer um protocolo de micropropagação de gladiolo e avaliar a eficiência da propagação *in vitro* na obtenção de mudas livres do patógeno. A análise realizada na amostra dos bulbos da Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (FAEPE)/Lavras/MG, revelou 98% de incidência de *Fusarium* sp. e 5% de *Curvularia*, e na amostra da Schoenmaker/Holambra/SP, não detectou-se a presença de *Fusarium*. Os isolados de *Fusarium* sp. obtidos da análise dos bulbos de gladiolos das variedades White Friendship e Tradehorn da FAEPE foram caracterizados morfológicamente e constaram de espécies de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*. Através do teste de variabilidade, observou-se que houve variação significativa entre os isolados das espécies, expressando sintomas nas folhas novas, velhas, no corno novo e alteração no diâmetro do corno, sem interferência na altura das plantas do cultivar White Friendship, porém, não houve um comportamento diferencial dos isolados dentro das espécies de *Fusarium*. Para o teste de patogenicidade nos cultivares White Friendship e Tradehorn, todos os isolados foram patogênicos, evidenciando diferentes graus de suscetibilidade à infecção dos isolados fúngicos. O método de inoculação *in vitro* mostrou eficácia na obtenção de respostas rápidas referentes à patogenicidade. Observou-se que o estabelecimento dos meristemas de gladiolo em concentrações de benzinoaminopurina (BAP) e cinetina combinadas com ácido naftaleno acético (ANA) comprovou efetividade na obtenção de plântulas isentas de *Fusarium* sp.

* Comitê Orientador: Mário Sobral de Abreu - UFLA (Orientador), Silvério José Coelho - UFLA, Patrícia de Oliveira Paiva - UFLA

ABSTRACT

PENA, Rosângela da Conceição Marques. Rottenness of Palma de Santa Rita *Fusarium* (*Gladiolus x grandiflorus* L.): identification, variability, pathogenicity and acquirement of gladiolus seedlings from meristem culture. Lavras: UFLA, 1999. 95p. (Dissertation – Master Program in Phytopathology) *

Aiming to obtain a better knowledge on the occurrence of fusariosis on gladiolus, thus avoiding further losses in the flower business/market, the present piece of work was designed for the evaluation of the incidence of *Fusarium* sp. in commercial corm cultivars; establishment of a protocol for gladiolus micropropagation and the evaluation the efficiency of *in vitro* propagation as for the acquirement of pathogen-free cuttings. The analysis performed on bulbs samples furnished by the Fundação de Apoio, Pesquisa e Extensão (FAEPE)/Lavras/MG revealed a level of 98% of incidence of *Fusarium* sp. and 5% of *Curvularia*, while the Schoemaker/ Holambra/SP sample showed absence of pathogens. The *Fusarium* isolates obtained from the analysis on gladiolus corms of White Friendship and Tradehorn varieties from FAEPE were morphologically characterized, as consisting of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* species. In the second experiment it was possible to verify, through the variability test, that there was significant variation among the isolates of the species, symptoms in young and old leaves, young corm and alteration in corm diameter having been expressed, although no interference on the White Friendship cultivar plants height occurred. Yet, there wasn't a differentiated behaviour of the isolates of *Fusarium* species. As for the pathogenicity test on both White Friendship and Tradehorn cultivars, all isolates were pathogenic, stressing different susceptibility of cultivars to the infection by fungal isolates. The *in vitro* inoculation method proved efficient for obtaining fast responses concerning pathogenicity, with a few restrictions, thou. It was observed that establishment of apical buds of gladiolus in concentrations of benzoinoaminopurina (BAP) and Kinetin associated with acetic naftalene acid (ANA) proved to be effective as for the obtention of plants free from *Fusarium* sp.

* Guidance Committe: Mário Sobral de Abreu – UFLA (Major Professor),
Sívério José Coelho – UFLA, Patrícia de Oliveira Paiva – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

Desde o início do século passado, a floricultura nacional, até a década de 1950, era pouco expressiva, tanto econômica como tecnologicamente, caracterizando-se como uma atividade paralela a outros setores agrícolas. Atualmente, a horticultura ornamental do país vem apresentando um amplo desenvolvimento, abrangendo o cultivo de plantas ornamentais, flores de corte e plantas envasadas, floríferas ou não, até a produção de sementes, bulbos e mudas de árvores de grande porte. Com o incremento do cultivo, vários fatores contribuem para o insucesso da atividade, entre eles, destacando-se as doenças fúngicas que podem ser consideradas fator limitante para determinadas plantas ornamentais.

O gladiolo está entre as flores de corte mais comuns no mercado. Em tempos passados, foi uma das flores mais comercializadas, porém, tem sofrido significativo decréscimo nos últimos anos, devido a uma série de fatores como a podridão do bulbo ou *Fusarium* amarelo, importante doença que causa elevados prejuízos nas cultivares suscetíveis, perdas consideráveis nos campos de produção de bulbos e flores, redução do número de produtores e inviabilidade econômica do material propagativo, não somente em gladiolos, mas também em outras espécies de Iridaceae.

O uso de cultivares resistentes pode ser o único meio de controle eficaz e econômico para a doença. Jones e Júnior (1975) afirmam que a preocupação dos produtores com o desenvolvimento de novas cultivares está relacionada aos caracteres agrônômicos como: tamanho e forma da espiga floral, cor e qualidade das flores, e produção de bulbos e bulbilhos. Poucas pesquisas têm sido realizadas visando conhecer o nível de resistência das cultivares de gladiolos a *Fusarium* e proporcionar aos agricultores indicações de cultivares adequadas para o plantio em áreas contaminadas. Certas cultivares com excelentes

caracteres quanto à resistência a *Fusarium* foram citadas por Wilfret e Magie (1979) e Wilfret (1981, 1986, 1993), embora apresentassem sérias limitações à comercialização.

Para o *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*, já foram identificadas duas raças, descritas, respectivamente, como 1 e 2. Segundo Mes e colaboradores (1997), a cultura volta a ser novamente ameaçada com o aparecimento da raça 2 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*, a qual, vem dizimando grandes áreas de cultivo de gladiolo.

A padronização de métodos eficientes para a produção e determinação da concentração de inóculo que permita agilizar o aparecimento dos sintomas nas plantas, é de fundamental importância para a realização dos vários tipos de estudos sobre *Fusarium* sp. e seu hospedeiro, com destaque para o teste de patogenicidade e caracterização da variabilidade.

A utilização da técnica de micropropagação *in vitro* a partir de meristemas pode ser uma importante alternativa para a obtenção de um grande número e qualidade de material propagativo, com vista a sua utilização em programas de melhoramento visando resistência à fusariose.

Desta forma, o trabalho tem como objetivos:

- caracterizar morfológicamente *Fusarium* em gladiolo;
- determinar a incidência, variabilidade e patogenicidade de *Fusarium* sp. nas cultivares White Friendship e Traderhorn comercializados no Brasil;
- micropropagar plantas de gladiolo visando material isento de *Fusarium* sp.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos botânicos do gladiolo

O gladiolo é uma planta tropical e subtropical da família botânica Iridaceae, subfamília Ixioidea envolvendo entre 250 e 300 espécies (Rees, 1992). A origem do gladiolo está na África, embora seja encontrado em todas as áreas da África e do Mediterrâneo, com grande concentração na África do Sul. Segundo Joly (1993), Rees (1992) e Wilfret (1992), o híbrido designado de *Gladiolus x grandiflorus* L. é o principal representante do gênero, apresentando diferentes formas, cores ou variedades botânicas. Salinger (1991) considera-o como o segundo mais importante grupo de flores cultivado a partir de órgão de armazenamento. Denominado popularmente de Palma de Santa Rita, flor de corte das mais procuradas às vésperas do dia de finados e datas festivas.

Os gladiolos são plantas pertencentes ao complexo grupo de herbáceas bulbosas, que atingem de 50 a 90cm de altura, com bulbo-sólido ou cormo, folhas laminadas e longas, caule denominado escapo e inflorescência tipo espiga, ereta, não ramificada, cujas flores são dispostas em duas fileiras grandes e de longa duração. O número, tamanho e cor das flores são variáveis, de acordo com a espécie ou cultivar; o florescimento pode ocorrer em qualquer época do ano, em condições ideais de cultivo (Joyce, 1994; Lorenzi e Souza, 1995).

A cultura do gladiolo (*Gladiolus x grandiflorus* L.) tem no Brasil, elevada importância econômica na horticultura ornamental como flor de corte. As plantas são propagadas por sementes e vegetativamente através de coleta de bulbilhos formados ao redor do bulbo-mãe, que é considerada por Salinger (1991), a principal técnica de reprodução comercial de gladiolo. A propagação através de sementes é somente utilizada para programas de melhoramento genético e obtenção de híbridos.

Segundo Crockett (1977) e Salinger (1991) o bulbo-sólido ou corno é uma estrutura do caule que possui a base intumescida com o acúmulo de nutrientes de reserva, envolto com restos foliares secos com aparência de escamas, apresentando nós e entrenós bem marcados e evidentes. A parte mais importante do bulbo consiste de um tecido de reserva formado de células do parênquima. Seu ápice possui uma gema vegetativa que se desenvolve em folhas e flores.

2.2 Aspectos culturais, econômicos e fitossanitários da cultura

Segundo dados do Boletim Semanal da Agrícola Schoenmaker, sob o ponto de vista econômico, no contexto nacional, a quantidade comercializada de bulbos de gladiolos vem apresentando decréscimo em relação ao total de flores de corte nos últimos três anos, com taxas médias de 695.000, 533.000 e 495.000 ha, respectivamente. Segundo Amaral (1999)*, a tradição de uso de gladiolo na semana santa e finados particularizou o seu comércio a essas datas, reduzindo a preferência como flor de consumo diário. O surgimento de outras alternativas de flores cortadas, segundo Olivetti, Takes e Matsunaga (1994), contribuiu para a redução da produção, pois, tratava-se de um gênero extensivamente cultivado e comercializado como flor de corte, enquanto havia poucas opções no mercado brasileiro. Galli (1988) afirma que a importação de matrizes nas décadas de 1960 e 70, em decorrência do pequeno número de variedades no mercado e visando aumentar a oferta, provocou redução drástica no cultivo, diminuindo, inclusive, o número de produtores em consequência da não adaptação ao clima e da suscetibilidade a pragas e doenças.

*Amaral. Comunicação pessoal. 1999. (SDW Flower Bulbs, Agrícola Schoenmaker de Wit Ltda, 13.825.000 - Holambra, São Paulo, Brasil).

Para Pinney e Hildebrandt (1968), a cultura é acometida por inúmeros patógenos, incluindo bactérias, vírus, nematóides e fungos. As doenças podem comprometer folhas, flores, bulbos e raízes (Palmer, Pryor e Steward, 1958; Jenkins et al., 1970; Magie e Cowperthwaite, 1954; Magie, 1957/1967; Magie e Poe, 1972, citados por Wilfret, 1992).

Dentre todos os fatores responsáveis pelo declínio da produção da cultura está a suscetibilidade às espécies de *Fusarium*, que leva a alterações no estado morfológico da planta e, conseqüentemente, à morte das mesmas (Wilfret e Magie, 1979; Kaur, Arora e Khanna, 1989). A fusariose afeta raízes e principalmente a extremidade basal do bulbo (McClellan, 1945; Pirone, 1970; Magie, 1971; Remotti e Löffler, 1996; Remotti, Löffler e Vloten-Doting, 1997) causando também a podridão do bulbo e redução do comprimento dos brotos (Bald, Suzuki e Dayle, 1971; Kucharek, Simone e Mullin, 1978). Segundo Pape (1977), ela provoca perdas especialmente graves durante todo o ano, e a intensidade do ataque depende da variedade. Sem dúvida, essa é, hoje, a mais séria e destrutiva doença nas áreas de produção dessa cultura.

2.3 Etiologia e histórico da fusariose em gladiolo

Fusarium oxysporum Schlecht f.sp. *gladioli* (Massey) Snyder e Hansen tem sido relatado em gladiolo, causando doença que recebe diversos nomes comuns, em alguns casos associados aos sintomas, em outros, a diferentes denominações do patógeno. Os nomes encontrados são: podridão sólida (Massey, 1916); podridão seca (Massey, 1918); podridão de *Fusarium* (Massey, 1922; MuCulloch e Weigel, 1941, citados por Júnior, 1953); *Fusarium* amarelo ou putrefação basal (Anderton e Park, 1989; Rees, 1992); podridão do bulbo e podridão da haste (Pitta, 1995); podridão do bulbo (Boerema e Hamers, 1989; Remotti e Löffler, 1996; Remotti, Löffler e Vloten-Doting, 1997).

Rees (1992) considera o patógeno muito importante em toda as áreas produtoras de gladiolo, em consequência das grandes perdas anuais que acarreta para a cultura. Segundo Miller, 1960, citado por Bald, Suzuki e Dayle (1971), a podridão de bulbos e raízes, causadas por FOG (*Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp. *gladioli* (Massey) Snyder e Hansen) em *Lilium longiflorum*, tem muito em comum com a podridão de *Fusarium* de outras espécies das famílias Liliaceae, Amaryliaceae, Iridaceae.

Existem numerosas referências de diversos autores à doença de *Fusarium* em gladiolos mas com descrições nem sempre suficientes para a identificação. As citações mais antigas descrevem a doença mais claramente.

Um dos primeiros relatos de fusariose em gladiolo apareceu em 1909, em uma nota de um produtor rural da Califórnia, que descreve podridão interior do bulbo e amarelecimento de folhas (Pyril, 1909, citado por MuCulloch, 1944).

Posteriormente, em 1916 e 1918, duas doenças fúngicas foram consideradas importantes em bulbos de gladiolos com os nomes de podridão sólida e podridão seca, respectivamente, e uma terceira, em 1922, designada de podridão de *Fusarium*. Segundo Massey (1926), embora a podridão de *Fusarium* já tivesse sido observada em 1912 e em quantidade suficiente para atacar com considerável grau de severidade, por vários anos nenhuma atenção foi dada a doença, não sendo conhecida qualquer publicação até 1916.

Até 1920, a doença causada por *Fusarium* conhecida comumente como amarelos, murcha ou podridão do centro, não havia sido considerada grave até aquele ano, porém, disseminou-se rápida e destrutivamente por todas as regiões produtoras dos Estados Unidos (MuCulloch, 1943). Massey, em 1922, publicou uma pequena nota sobre a doença. Por volta de 1923, um relato apontava que um grande número de bulbos de gladiolos do tipo Nanus, provenientes de duas localidades da Califórnia, e aparentemente sadios, quando cortados apresentavam podridão no seu interior, com uma descoloração leve na cicatriz

basal e fibras vasculares marrons no centro. No ano seguinte, os tipos Nanus, Primulinus e Grandiflorus de gladiolos afetados com a mesma necrose vascular foram recebidos de várias áreas do oeste norte-americano e, em 1925 e 1926, amostras semelhantes foram enviadas da Costa do Norte, Mississipi e Nova Jersey (MuCulloch, 1943).

Van Poeteren, em 1925, relatou a doença vascular presente na Holanda e, em 1926, uma descrição completa da podridão de *Fusarium* em bulbos de gladiolos foi feita por Massey no Estados Unidos, confirmando tratar-se da espécie *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*. No ano seguinte, uma podridão seca em bulbos de gladiolos causada por *Fusarium* foi descrita na Inglaterra por Wallenweber. Em 1939, foi descrita por Moore como uma doença vascular de *Fusarium*. Depois Bellard, Dimock e Nelson (1940), além de outros pesquisaram e publicaram relatos sob a doença vascular (Massey, 1926; MuCulloch, 1944; Boerema e Hamers, 1989).

Nos Estados Unidos, plantas de gladiolo cultivadas especialmente na Flórida, foram afetadas por FOG. Outras espécies de *Fusarium*, inclusive *F.subglutinians* e *F. roseum* Link: Fr (W. C. Snyder e H. N. Hans), induziram também o fracasso da colheita (Woltz, Magie, Cwitkin, Nelson e Toussoun, 1978; Viljoen e Wingfield, 1995).

Ozer e Soran (1989) relataram a presença de *Fusarium oxysporum*, *F. equiseti*, *F. acuminatum* e *F. culmorum* em cravo; *F. oxysporum* e *F. equiseti* em gladiolo; *F. oxysporum* e *F. equiseti* e *Gibberella acuminata* em tulipas e *F. oxysporum* em freesia e jacintos em áreas da Turquia.

Foi encontrado pela primeira vez no Paquistão por Mirza e Shakir (1991), *Botrytis glandiolorum*, *Myrothecium roridum*, *Epicoccum nigrium* e principalmente, *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*. No mesmo ano, em Montbretia, Itália, o patógeno foi observado pela primeira vez. A doença causou severo amarelecimento e murchamento das folhas além de florescimento

incompleto e os bulbos mostraram-se com descoloração vascular marrom escura (Infantino e Rumine, 1993).

A putrefação de raízes de gladiolo foi observada por Chen e colaboradores (1994) em Shangai, China, tendo os patógenos sido identificados como *Fusarium* sp., inclusive *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*.

O primeiro relato da fusariose no Brasil em cultivares de gladiolos manifestando sintomas da doença foi feito por Fernandes, em 1943. O material colhido em diversos estabelecimentos florícolas, segundo a classificação do engenheiro agrônomo Jefferson Firth Rangel e posterior confirmação no mesmo ano por Josué Deslandes, revelou tratar-se de uma doença causada por uma espécie de *Fusarium*.

2.4 Sintomatologia

A fusariose em gladiolo é uma das mais sérias enfermidades em áreas quentes e de incidência baixa em condições mais secas. É a mais sistemática das patologias foliares, não produz lesões óbvias e desenvolve-se no bulbo e nos tecidos vasculares da planta; os caules jovens freqüentemente estão curvados (Salinger, 1991). Embora a infecção causada por *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp. *gladioli* (Mass.) Snyder e Hansen atinja principalmente o bulbo; as folhas, flores e raízes são também afetadas (Forsberg, 1976).

Bigre, Morand e Tharaud (1990) citam que as condições ótimas para o desenvolvimento desse agente etiológico estão em temperaturas em torno de 25-26°C, solos levemente compactados, pH entre 5-6 e presença de composto orgânico. Os mesmos autores descrevem os sintomas na parte aérea com amarelecimento ou murcha da folhagem, atacando, em primeiro lugar, sua base. As folhas são suscetíveis ao ataque de FOG, observando-se um amarelecimento das suas extremidades e murcha, enfraquecimento e seca da folhagem e a morte

latente da planta. Segundo Pitta, Cardoso e Cardoso (1989), as plantas podem ficar raquíticas e não chegar a produzir quando o índice de infecção é alto. Pitta (1995) ainda descreve sintomas como flacidez de parte ou de toda a planta, por falta d'água, embora o solo esteja úmido.

Diferentes sintomas podem surgir nas flores quando a planta está infectada por FOG. Segundo Forsberg (1976), elas demoram a produzir e, quando produzem, não abrem normalmente. De acordo com a classificação da qualidade das espigas florais, ocorre redução no número e tamanho e, alteração na forma das flores. O autor complementa que, em variedades coloridas, a cor da pétala é mais escura que o normal, o tamanho menor e os bordos menos franzidos. Wilfret (1981) relata a ocorrência de desconfiguração completa da flor, inviabilizando-a para comercialização.

Em bulbos, a infecção pode ocorrer no campo e a doença se manifestar com maior intensidade durante o armazenamento ou no plantio subsequente (Cardoso, 1980). A podridão do bulbo ocasionada pelo fungo, assumiu uma importância muito grande entre as doenças de gladiolos, devido às suas particularidades biológicas. Confusão a respeito de sua biologia foi esclarecida por investigações que demonstraram sua conexão com as deficiências culturais e prejuízos causados na armazenagem (Fernandes, 1943).

Segundo Pitta, Cardoso e Cardoso (1989), podem-se notar lesões descoloridas na parte central dos bulbos, acompanhadas de escurecimento dos vasos circundantes. Superficialmente, no terço inferior próximo à região das raízes, notam-se manchas pardo-avermelhadas, localizadas sob a casca. Com o desenvolvimento, essas manchas aumentam de tamanho, tornando-se irregularmente circulares, escuras e deprimidas no bulbo, avançando para a haste e apresentando zonações concêntricas (podridão seca) (Pitta, 1995).

Bigre, Morand e Tharand (1990), os sintomas típicos ocorrem no bulbo com o disco dilatado e apresentando uma protuberância localizada. Em corte

transversal, observa-se a podridão no "coração" do bulbo e necrose na região dos vasos. No centro do bulbo cortado aparecem pintas ou manchas marrons. A partir de 1 a 5 pintas, considera-se como fusariose leve; maior número de pintas ou manchas com 1cm de diâmetro ou maior, considera-se com fusariose severa. Na Holanda é dada atenção ao aspecto externo do bulbo, pois a fusariose interna desenvolve-se bem menos devido ao clima. Cada mancha, independente do tamanho, é considerada na contagem.

Três formas de podridão têm sido distinguidas, segundo Forsberg (1976), principalmente por seus efeitos nos bulbos:

- na forma vascular da doença, o bulbo dividido irá revelar uma descoloração de cor castanha no núcleo e os feixes vasculares escuros estendendo-se lateralmente no seu interior. No estágio avançado da doença, a infecção atinge a superfície do bulbo em seus nós e lesões de cor castanha se desenvolvem nessas plantas;

- na forma de podridão parda da doença, lesões de cor parda, castanha ou preta vão aparecer em qualquer área do bulbo, mais comumente na base, e o tecido podre se espalha por todo o bulbo. Descoloração vascular não está associada com essa forma da doença;

- a forma de podridão seca basal da doença difere da podridão castanha, principalmente na espessura e posição das lesões. No caso da podridão basal, as lesões ocorrem somente na base dos bulbos e, geralmente, se restringem ao 1º e 2º internódios. As lesões são visíveis quando os bulbos são retirados e, sob condições favoráveis de cura, não estendem-se após a colheita. O tecido doente apresenta-se de cor marrom, sólido, áspero e freqüentemente escamoso depois de tirado do solo, a área afetada é funda e existe uma descoloração clara em todo o tecido doente e o saudável. O mesmo autor cita que quando bulbos infectados são plantados, ou não haverá brotação ou eles irão brotar fracamente e morrer

em seguida. Os bulbos que apresentam infecções menos severas poderão produzir plantas que crescerão normalmente ou tardiamente.

2.5 Patogênese e epidemiologia

Pesquisas mostraram que a podridão do bulbo-sólido é uma fase da moléstia, cujo aspecto é mais sério do que o observado no campo. A sua importância foi tomada evidente devido a ocorrência de grandes prejuízos na armazenagem. A infecção dos bulbos ocorre no campo e a doença pode manifestar-se em qualquer fase do desenvolvimento sendo, no entanto, comum em plantas adultas no início da colheita. Durante o armazenamento, os sintomas tendem a aumentar, podendo ocorrer desintegração total dos bulbos mais afetados. Naqueles que apresentam manchas externas, elas aumentam em tamanho tornando-se irregularmente circulares, enegrecidas e aprofundadas devido à seca dos tecidos (Cardoso, 1980).

A deterioração dos bulbos na fase de armazenamento é um prolongamento daquela iniciada no campo, continuando a invadir o centro e circunvizinhanças dos tecidos vasculares. Após a colheita, os bulbos novos de variedades suscetíveis podem ser completamente destruídos durante um curto espaço de tempo (Cardoso, 1980; Fernandes, 1943).

Considerando que as grandes perdas de bulbos por *Fusarium* ocorrem durante o armazenamento, o controle nesse período é necessário, tanto para o sucesso da armazenagem como para o controle das injúrias sofridas durante a colheita, de modo que os tecidos não fiquem expostos ao foco de infecção de outros microrganismos (Júnior, 1953). O parasita desenvolve-se rapidamente, especialmente quando a porcentagem é elevada, podendo ocorrer a desintegração total do bulbo com uma podridão seca de coloração marrom-preta (Pitta, Cardoso e Cardoso, 1989 e Pitta, 1995).

Boerema e Hamers (1989) afirmam que os bulbos são infectados devido a produção de microconídios. Segundo Bigre, Morand e Tharand (1990), aparentemente saudáveis, a fusariose pode continuar evoluindo e sendo transmitida por contato de bulbo a bulbo, quando os bulbos contaminados são armazenados.

Os micélios de FOG crescem através dos vasos vasculares; conidióforos aparecem, às vezes, como um sedimento de cor rosa e localizam-se nos focos de infecção dos bulbos. O fungo pode propagar-se também com os bulbos novos, invadindo a planta desde o solo (Pape, 1977).

Observações histológicas foram realizadas por Bald, Suzuki e Doyle (1971) em bulbos com podridão, os quais observaram que a podridão é consequência, principalmente, do desenvolvimento intercelular dos micélios de *Fusarium*.

Bald (1953) descreve a conexão vascular entre as raízes basais, bulbo mãe, bulbo filho e brotos. Pelo fato de todos estarem na linha direta de ascensão da água e metabólitos, podem estar mais sujeitos à invasão sistêmica. O autor cita, ainda, que o inóculo de FOG persiste como micélios e clamidósporos dentro dos bulbos de gladiolos e na inserção das raízes contráteis mortas. O mesmo autor examinou bulbos de gladiolo e revelou que quando plantados no campo com micélios e clamidósporos de FOG ativos ou dormentes, a doença torna-se rapidamente severa.

A infecção latente ou dormente de fungos fitopatogênicos tem sido descrita em várias interações planta-patógeno (Verhoeff, 1974). Gäumann, citado por Verhoeff (1974), definiu a infecção latente ou dormente como aquela que existe sem apresentar sintomas aparentes macroscopicamente, mas, o crescimento da infecção da hifa é retardado.

A infecção latente de *Fusarium oxysporum* tem sido demonstrada em bulbos de narcissos (Langerak e Haanstra-verbeek, 1977) e bulbos de tulipas (Bergman e Bakker-van der Voort, 1979).

A existência da infecção latente em bulbos de gladiolos por *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* (Massey) Snyder e Hansen foi sugerida por Magie (1966) e Magie (1971) e Henis e Zilberstein (1973) aprovaram a evidência desse fato.

A existência da infecção latente de *Fusarium* em bulbos de gladiolos pode causar sérios problemas. Quando bulbos aparentemente saudáveis são plantados, desenvolvem, às vezes, severos sintomas de *Fusarium*, mesmo quando tratados com fungicida apropriado. O grau de perda depende das condições de crescimento, especialmente da temperatura (Roebroek, Groen e Mes, 1990).

A murcha do *Fusarium*, profundamente enraizada no interior dos bulbos, dificilmente pode ser observada, já que os sintomas se tornam visíveis na superfície dos bulbos somente em estágios avançados da doença. Bulbos infectados são freqüentemente transportados e plantados sem suspeita das suas condições (MuCulloch, 1944).

A podridão do bulbo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* pode existir como infecção latente no bulbo e causar podridão no armazenamento (Magie, 1971; Wilfret e Magie, 1979; Wilfret, 1981/1993).

2.6 Caracterização de *Fusarium* sp.

O gênero *Fusarium* é bastante heterogêneo, com ampla distribuição geográfica e inclui muitas espécies (Windels, 1991). Historicamente, tem havido grandes discussões sobre os conceitos taxonômicos de fungos fitopatogênicos, principalmente em Ascomicotina e Deuteromicotina que, apesar de terem características morfológicas semelhantes, variam quanto a patogenicidade, em diferentes hospedeiros (Mongan-Jones, 1992). O critério de diferenciação com base no reconhecimento fisiológico tem sido usado para a diferenciação

adicional intra-específica, dando suporte à caracterização taxonômica. A identificação de *Fusarium* a nível de espécie, forma especial e de raça é difícil, uma vez que muitas variáveis devem ser consideradas (Windels, 1991).

As características morfológicas constituem um dos principais critérios para a separação das espécies de *Fusarium* (Burgess, Liddell e Summerell, 1988; Nelson, Toussoun e Marasas, 1983), destacando-se a conidiogênese, que é reconhecida como uma indicação no estabelecimento das relações do estágio anamórfico desse fungo (Ventura, 1994). Os critérios taxonômicos freqüentemente usados nas chaves de identificação são a forma da célula basal e o tamanho dos macroconídios, a presença ou ausência e forma dos microconídios, a formação dos microconídios e o tipo de células microconidiogênicas (fiálides) (Nelson, Toussoun e Marasas, 1983). A presença ou a ausência de clamidósporos é uma característica primária usada, inclusive, para o agrupamento em seções. A morfologia das culturas, a pigmentação e as taxas de crescimento em BDA (Batata-Dextrose-Ágar), apesar de incluídas em algumas chaves e terem valor taxonômico, são características secundárias, tendo em vista a ampla variabilidade genética dentro das espécies deste fungo, podendo-se ter diferentes respostas fenotípicas em função do ambiente.

O sistema proposto por Snyder e Hansen (1940) baseia-se em critérios morfológicos em que as espécies são diferenciadas, principalmente, pela presença ou ausência de microconídios e clamidósporos e pela forma dos microconídios. Algumas modificações no sistema de identificação de Snyder e Hansen (1940) foram feitas por Messiaen e Cassini (1968), que estabeleceram critérios para a identificação das espécies de *Fusarium*. Pelo sistema de Booth (1971), as espécies foram caracterizadas pelas células esporogênicas, taxa de crescimento, pigmentação e presença de clamidósporos; microconídios também são considerados.

As espécies do gênero *Fusarium* são amplamente distribuídas no solo e substratos orgânicos, sendo que o maior interesse predomina sobre os fitopatogênicos. Segundo Booth (1971), *Fusarium oxysporum*, além de ser economicamente a espécie mais importante do gênero, é também uma das que apresentam maior variação. A intensa variabilidade morfológica de *Fusarium oxysporum* é evidenciada por Messiaen e Cassini (1968) e por Waite e Stover (1960).

Nelson, Toussou e Marasas (1983) descrevem características culturais de *Fusarium oxysporum* baseadas em culturas crescidas em BDA durante 10-14 dias de incubação. As descrições de conídios, conidióforos e clamidósporos foram baseadas em culturas crescidas em CLA.

Nirenberg (1981) e Booth (1977) utilizaram o tamanho dos conidióforos primários como característica diferencial entre *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*. O primeiro possui fiálides simples e curtas (menores do que 20mm, enquanto que *Fusarium solani* as apresenta longas (maiores que 45mm).

Para Daughtrey, Wick e Peterson (1995), *F. oxysporum* geralmente forma macroconídios, microconídios e clamidósporos abundantes na cultura. Macroconídios são de formato fusiforme, delicado e parede fina. A célula apical é atenuada e a base pedicelada. Macroconídios têm três a cinco septos e são produzidos no início ou ramificado, fiálides lateral e depois tipicamente dentro de esporodóquio. De formato oval ou reniforme, os microconídios produzidos em falsa cabeça e em maior número, muitas vezes apresentam apenas uma célula. Os microconídios de *F. oxysporum* são produzidos em monofiálides curtas e *F. solani* em fiálides longas. Os clamidósporos de *F. oxysporum* são intercalares ou terminais e são formados sozinhos ou em pares.

2.7 Variabilidade e resistência à *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* (Massey) Snyder e Hansen

Nos últimos anos, diferentes métodos têm sido usados para determinar a variabilidade em *Fusarium*. Além dos testes de patogenicidade, estudos de relacionamento genético e filogenia entre espécies e isolados têm sido pesquisados, destacando-se as proteínas, isoenzimas (Partridge, 1991) e o polimorfismo do DNA (Grajal-Martin, 1993; Kin et al., 1992; Kistler et al., 1987). Estudos com VCG. têm sido usados na tentativa de identificar formas especiais e raças de *Fusarium*, porém, tais métodos têm sido pouco aplicados a estudo de variabilidade e patogenicidade de *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*.

Palmer e Pryor (1958) testaram a resistência de 183 cultivares a três isolados de FOG, e a maioria apresentou-se altamente suscetível aos isolados. Pryor (1971) expôs sete cultivares de gladiolos com cores diferentes a infecção por FOG em condições de campo durante 6 anos. A cultivar "Wild Rose" apresentou-se altamente resistente.

Testes de patogenicidade e virulência em cinco cultivares de gladiolos foram realizados por Woltz e Magie, em 1973. Os bulbos das cultivares foram cortados e inoculados com 4 gotas de suspensão de 2×10^6 microconídios/ml de seis isolados de FOG.

Bulbos de quarto cultivares de gladiolo foram segmentados com 4 cortes uniformes na superfície e inoculados com uma gota de suspensão de 1×10^6 microconídios/ml. "Manatee White" foi a cultivar que apresentou respostas de não suscetibilidade aos isolados (Woltz, 1974)

Jones e Júnior (1975) conduziram uma seleção de plantas de gladiolo plantadas em áreas infectadas por *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* para conferir resistência ao patógeno. Fontes de resistência foram encontradas em

algumas cultivares e espécies de gladiolos, porém, certas cultivares de flores grandes foram altamente suscetíveis ao ataque desse patógeno.

Bulbos da cultivar Friendship foram inoculados com 12 isolados de várias espécies de *Fusarium* antes de serem postos na câmara fria e posterior plantio. Observaram que três dos isolados reduziram a produção de flores e bulbos (Woltz, Magie, Nelson e Toussoun, 1978).

Foi relatado por Wilfret (1986) que 100 bulbos da cultivar "Dr. Magie" (Wild Rose x Friendship) provaram ser tolerantes a FOG, quando imersos por 5 minutos em suspensão de esporos. O número de espigas florais produzidas foi de 36 e 78, para Friendship e "Dr. Magie", respectivamente.

Roebroek e Mes (1992) realizaram um estudo sobre o relacionamento entre grupos de compatibilidade vegetativa e raças de 31 isolamentos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* e constataram que a relação entre VCG e raças de FOG provaram ser complexas.

A variedade "Morning Mist", originária do cruzamento entre mudas GC-354 (Blue Baron x Beverly Ann) e GC143 (China Blue x Bervely Ann), mostrou-se tolerante ao *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*, segundo afirmações de Wilfret (1993). Bulbos foram mergulhados em suspensão de esporos composta por uma mistura de sete isolados patogênicos de FOG.

Mes, Door, Roebroek e Egmond (1994) investigaram a variação genética dentro de 57 isolados de FOG pela análise de RFLPs, usando uma sonda do DNA total do isolado de *F. oxysporum* f.sp. *dianthi*, proposto por Manicom e colaboradores.

Mes, Door, Roebroek e Egmond (1994) realizaram teste de patogenicidade utilizando bulbos das cultivares Peter Pears (suscetível a raça 1) e Nymph (suscetível a raça 1 e 2) que foram mergulhados em suspensão de esporos de 57 isolados de FOG. Os autores concluíram que o isolado G17 da Inglaterra, raça 1, causou pequena redução nas brotações e podridão no bulbo

em comparação com os outros isolados. O isolado G76 da Itália foi patogênico em Nymph tanto quanto os outros isolados da raça 1, em quanto que, Peter Pears apresentou-se moderadamente suscetível.

Suspensões de células da cultivar "Peter Pears", foram suplementadas com as concentrações 0; 0,06; 0,08; 0,10; 0,12 e 0,14mM de ácido fusárico. Observou-se que utilizando-se uma baixa concentração do ácido (0,06mM), ocorreu uma diminuição considerável do crescimento celular da cultura (Remotti, Löffler e Lous van Vloten-Doting, 1997).

Löffler, Straathof, Rijbrok e Roebroek (1997) plantaram onze cultivares de gladiolo em vasos de 10L contendo 5×10^3 ou 4×10^4 de propágulos por grama de solo. As cultivares "Raselind" e "Angelina" estabeleceram resistência aos isolados G2 e G5.

2.8 Aplicações da cultura de tecidos vegetais na fitopatologia

O processo de cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas nas quais um explante (célula, tecido ou um órgão) é isolado e cultivado sob condições de plena assepsia, em meio nutritivo artificial. Baseia-se no princípio da totipotencialidade das células, ou seja, qualquer célula no organismo vegetal contém todas as informações genéticas necessárias à regeneração de uma planta completa (Gallo e Crocomo, 1995; Pasqual, Hoffmann e Ramos, 1997).

A propagação de espécies vegetais *in vitro* apresenta vantagens em relação aos métodos convencionais, como a propagação de clones em qualquer época do ano, propagação de espécies que dificilmente seriam propagadas por métodos convencionais, rápida multiplicação clonal de espécies valiosas, eliminação de vírus e outras doenças em plantas infectadas (Gallo e Crocomo, 1995). Dependendo da finalidade da propagação, conforme descrito por

Murashigue (1974), a cultura de tecidos de plantas pode ser feita através de tecidos meristemáticos (gemas axilares, regiões apicais e o meristema propriamente dito) e/ou explantes não meristemáticos (peciolo, pedúnculos e o limbo foliar).

A cultura de tecidos de plantas tem produzido importante avanço nos campos da genética, fisiologia e patologia, esclarecendo aspectos básicos do crescimento normal e diferencial dos diversos genótipos, assim como subsidiando os estudos sobre a relação parasita-hospedeiro e o controle de plantas doentes (Wilfret, 1971).

De acordo com Helgeson e Deverall (1983), citados por Duval, Caldas e Resende (1998), importantes contribuições na área da fitopatologia têm sido obtidas a partir de técnicas de cultura de tecidos

Através da propagação *in vitro* de meristemas é possível obter materiais vegetativos livres de patógenos, com redução do tempo de obtenção de plântulas para o cultivo (Batista, 1996). O cultivo de ápices caulinares e/ou meristemas tem sido usado também com o objetivo de superar o problema de contaminação patogênica de propágulos, tendo êxito em programas para propagação e multiplicação de material sadio, além de auxiliar o intercâmbio e melhoramento genético (Crisp e Walkey, 1974; Souza, 1988; Grattapaglia e Machado, 1990).

Para patógenos como fungos, bactérias e nematóides, a cultura de ápices caulinares de maior tamanho pode ser suficiente para garantir sua eliminação, uma vez que, em condições de cultivo, eles podem ser identificados no próprio meio de cultura (Luz, 1993). Outros patógenos, como micoplasmas, vírus e viróides, que utilizam o sistema vital da planta para sua multiplicação, podem ser mantidos nos propágulos vegetativos, comprometendo a qualidade do clone, podendo ser eliminados através de cultura de meristemas, com um ou dois primórdios foliares, sendo que esta eliminação ou limpeza ocorre basicamente

devido a ausência de tecidos vasculares e a velocidade de multiplicação celular (Quak, 1977; Walker, 1978; Pasqual, Hoffmann e Ramos, 1997).

⑤ Ventura (1993; 1994) acredita que a utilização das técnicas de micropropagação *in vitro* seja uma alternativa viável para a obtenção de materiais vegetativos uniformes em grande quantidade e livres de enfermidades, podendo ser utilizadas não só na produção de mudas sadias das cultivares suscetíveis, mas também dos novos genótipos com resistência a fusariose, pois muitas das plantas produzidas, especialmente aquelas que são propagadas vegetativamente, são infectadas sistemicamente com um ou mais patógenos (Bhojwani e Razdan, 1983).

A disponibilidade de informações relacionadas à eliminação de *Fusarium* sp. através de limpeza clonal ainda é limitada. No Brasil, Pescador e Koller (1992) micropropagaram abacaxi e constaram que através dessa técnica de cultivo, há possibilidade de produzir mudas matrizes isentas de fusariose ou gomose, causadas por *Fusarium moniliforme* Shel. var. *subglutinans*. No caso da banana, segundo Krikorian e Cronauer (1984), a cultura de tecidos tem sido utilizada para a produção de mudas em escala comercial, livres de mal-do-Panamá causado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*.

Em conseqüência disso, a cultura de tecidos de plantas tem sido utilizada como um meio rápido de propagação vegetativa na indústria de horticultura ornamental e explorada comercialmente em um largo número de espécies de plantas, portanto, considerada como uma grande promessa para a agricultura por possibilitar a produção de propágulos livres de doenças que podem ser facilmente disseminados (Holgate, 1977; Chu, 1985).


Com o aumento do consumo de flores de corte na Europa e a exportação mundial delas via Holanda, em particular, cresceu a demanda para produtos de cultura de tecidos (van Doesburg, 1989, citado por Jones e Sluis, 1991). A cultura de tecidos ou clonagem de meristemas tem sido utilizada para

propagação de vários gêneros como orquídea, lírio, cacto, violeta africana, banana ornamental e begônia. No Institute John Innes, no estado norte-americano da Flórida, centro precursor da cultura de tecidos de gladiolos e freesia, aproximadamente 8 milhões de plântulas de gladiolos são produzidos anualmente por cultura de meristemas (Anderton e Park, 1989). Rees (1972) afirma que os produtores de bulbos de gladiolo têm lançado no mercado boa parte deles com doenças, especialmente as causadas por fungos, ocorrendo com grande frequência a podridão causada por *Fusarium*.

É altamente desejável a taxa de multiplicação em larga escala de gladiolo, devido a sua importância comercial. Segundo Bajaj, Sidhu e Gill (1982), usando-se práticas convencionais, o número de bulbos filhos produzidos por um bulbo mãe em 1 ano é pequeno, sendo necessários de 8-10 anos para produzir um clone que seja grande o suficiente para propósitos comerciais. Todavia, usando vários métodos *in vitro*, esse tempo pode ser reduzido para dois anos (Reinert e Bajaj, 1977).

Segundo Rees (1992), o gladiolo e seus híbridos podem ser regenerados de explantes de brotos axilares com uma taxa de multiplicação de 3-5 a cada 6-8 semanas em subcultura seriada. Para Ginzburg e Ziv (1973), os reguladores de crescimento desempenham um papel importante na morfogênese e formação de bulbos. Ziv, Halevy e Shilo (1970) utilizaram explante de pedúnculo de inflorescência e obtiveram calo, gema e microbulbos em meio MS contendo 10mg/L de ANA e 0,5mg/L de cinetina.

O efeito de várias fontes de explante, tais como inflorescência, pedúnculo de flores, flor desnuda, brácteas, perianto e segmentos florais sobre a propagação *in vitro* de gladiolos, foi estudado por Bajaj, Sidh e Gill (1982). Além de diferentes meios de cultura de todos os explantes, calos de maior tamanho foram obtidos a partir de pedúnculo floral. Wilfret (1971), Hussey (1977) e Bajaj, Sidhu e Gill (1982) regeneraram plantas de gladiolos através de



cultura de calo. Segundo Kamo, Chen, e Lawson (1990) suspensões celulares também foram capazes de regenerar plantas de gladiolos.)

Plântulas de gladiolos foram regeneradas de haste da inflorescência de dois cultivares de gladiolo, entre 6-7 semanas. Ao meio básico MS, foi adicionada uma combinação de 10ppm de ANA e 0,5ppm de cinetina (Ziv, Halevy e Shilo, 1970).

Embora trabalhos com gladiolos tenham sido iniciados duas décadas atrás e muito progresso tenha sido alcançado, mesmo assim a regeneração de plantas de cultura de meristemas e também o aumento do número de plantas por bulbo, ainda existem problemas que impedem a aplicação de métodos de cultura de tecido para propagação em grande quantidade e exploração pela indústria de flor. Contudo, trabalhos básicos sobre vários fatores que influenciam a regeneração são necessários antes que o método seja desenvolvido para proporcionar material suficiente para o plantio em campo (Bajaj, Sidhu e Gill, 1992).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia e no de Cultura de Tecidos, do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.1 Análise fitossanitária dos bulbos, obtenção dos isolados, preparo do inóculo, obtenção das culturas e identificação das espécies

3.1.1 Determinação da incidência de *Fusarium* sp. em amostras de bulbos de gladiólo

Foram utilizados bulbos das cultivares comerciais White Friendship (branca) e Traderhorn (vermelha), procedentes da Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (FAEPE) em Lavras, MG e de plantios comerciais da Schoenmaker/Holambra, SP.

De cada amostra foram selecionados aleatoriamente 50 bulbos de cada cultivar. Esses foram submetidos, em laboratório, a um tratamento padronizado: retirada das túnicas e corte de fragmentos de tecidos vegetais infectados. Em câmara de fluxo laminar, realizou-se a desinfestação dos fragmentos, em álcool 70% por trinta segundos e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio 1% durante um minuto e posterior imersão em água destilada e esterilizada. Uma vez retirados, os fragmentos foram dispostos sobre papel de filtro esterilizado para secagem e, com auxílio de uma pinça previamente flambada, foram colocados cinco fragmentos em placas de Petri de 15cm de diâmetro contendo 40,0ml de BDA (200g batata-20g dextrose-20g ágar), suplementados com três gotas de sulfato de estreptomicina. Foram utilizadas quatro repetições, cada uma constituída por uma placa.

As placas foram mantidas em câmara de crescimento, a temperatura de $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ sob regime luminoso de luz branca fluorescente e fotoperíodo de 12 horas, durante três dias. Decorrido esse tempo, foram efetuadas observações sob microscópio estereoscópico, anotando-se a frequência de *Fusarium* sp. e outros fungos nos fragmentos de tecido.

3.1.2 Isolados de *Fusarium* sp. utilizados

Foram utilizados isolados obtidos de bulbos de gladiolo que apresentavam sintomas característicos da doença. Os isolamentos foram efetuados com a retirada de discos de micélio das extremidades das colônias de *Fusarium* sp. e transferidos para placas de Petri de 9,0cm contendo o meio de farinha de aveia e incubados por um período de sete dias em câmara de crescimento com temperatura de 23°C em regime de luz alternada (12 horas luz e 12 horas no escuro). A seleção das colônias foi feita com auxílio de microscópio estereoscópico, transferindo-se pequena massa de conídios utilizando-se agulha de aço, para meio de aveia ou BDA suplementado com sulfato de estreptomicina.

Para isolamento de *Fusarium* sp. e manutenção das culturas em forma de micélio, empregou-se o meio de batata, dextrose e ágar (BDA), na proporção de 200:20:20, e água destilada em quantidade suficiente para 1000ml de meio suplementado com três gotas de sulfato de estreptomicina após autoclavagem.

Para a produção de conídios foram utilizadas culturas com uma semana de idade cultivadas em meio modificado de farinha de aveia (30g aveia-15g ágar-1L água) suplementado com duas gotas de sulfato de estreptomicina (Tuite, 1969).

As culturas mantidas em tubo de ensaio com BDA permaneceram em câmara a $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ em regime de luz alternada (12 horas de luz/12 horas de

escuro). Culturas visando a produção de conídios foram mantidas em tubos contendo meio de aveia e incubadas a 23°C e também sob regime de alternância luminosa, com 12 horas de luz branca fluorescente alternadas com 12 horas de escuro. Ambas as culturas depois de crescidas, foram mantidas em refrigerador, onde permaneceram sob temperatura de aproximadamente 5°C.

3.1.3 Preparo de inóculo

Para ensaios efetuados com micélio de *Fusarium* sp., o preparo do inóculo consistiu da retirada de um fragmento de micélio de cultura em tubo de BDA, o qual foi transferido para o centro de placas de Petri de 9,0cm de diâmetro contendo 20,0ml de BDA comum. Após sete dias a 21±2°C em regime de alternância luminosa, discos de micélio foram retirados assepticamente das extremidades das colônias com auxílio de um furador de rolha de 3,0mm de diâmetro interno, constituindo-se, assim, no inóculo a ser utilizado.

Quando o inóculo constava de conídios de *Fusarium* sp., pequena porção de massa deles era retirada com a ponta da alça de platina e transferida para placas de Petri de 9,0cm de diâmetro contendo meio de aveia. Riscando-se a superfície do meio, obtinha-se, na parte central das colônias, a produção de macroconídios e nas laterais microconídios, facilitando a visualização e retirada dos conídios. As placas foram incubadas a 23°C sob regime de alternância luminosa durante uma semana. Depois, o inóculo foi preparado por suspensão de conídios em água esterilizada, adicionando-se uma gota de Tween 80 (polioxietile sorbitano monooleato) para melhor dispersão da massa conidiana, a qual foi espalhada com espátula de Drigalsky.

3.1.4 Obtenção das culturas

Na individualização dos conídios para a obtenção de culturas monospóricas foi obedecida a seguinte metodologia: do inóculo crescido em meio de farinha de aveia foi obtida inicialmente uma suspensão concentrada e em seguida realizado o processo de quatro diluições. Retirou-se, com uma micropipeta, 1µl da suspensão menos concentrada de esporos, transferindo-o para placa de Petri de 9,0cm, contendo ágar-água (2g). Após 24 horas de incubação, operando sob microscópio ótico em câmara de fluxo laminar, foram selecionados esporos que encontravam-se totalmente isolados e, em seguida, foram transferidos com um estilete de ponta fina para placa de Petri de 9,0cm com meio de farinha de aveia e mantida na mesma condição anterior. Cerca de 70% dos fragmentos, após quatro dias, apresentaram-se recobertos pelo micélio do fungo. O ensaio constitui-se de dez repetições para cada um dos 45 isolamentos, totalizando 450 parcelas.

3.1.5 Identificação das espécies

A identificação de espécies de *Fusarium* presentes em bulbos de gladiolo seguiu os critérios adotados por Massey (1926), Booth (1971;1977) e Nelson, Toussoun e Marosas (1983). Foram desenvolvidos ensaios com o objetivo de conhecer possíveis variações morfológicas e culturais dos isolados selecionados, com base nas seguintes características:

3.1.5.1 Morfologia dos conídios e clamidósporos

Macroconídios e microconídios foram retirados de colônias com sete dias de crescimento com auxílio de um estilete previamente flambado. A

formação de clamidósporos foi observada após quinze dias, nas condições descritas no item 3.1.3 e à medida em que isso ocorreu, eram preparadas lâminas permanentes para microscópio.

Foram medidos comprimento e largura de 50 macroconídios, 50 microconídios e 20 clamidósporos, em microscópio ótico com objetiva 40x e dotado de ocular micrométrica.

Quanto a aspectos morfológicos qualitativos, foram anotadas as características predominantes em cada isolado quanto à forma e extremidade dos conídios e disposição dos clamidósporos.

3.1.5.2 Índice de crescimento micélio de *Fusarium* sp. (ICM)

O ICM foi desenvolvido com os nove isolados selecionados, em placas de Petri de 9,0cm de diâmetro com meio de aveia-ágar, suplementado com sulfato de estreptomicina.

O inóculo, constituído por disco de micélio de 3,0mm de diâmetro e preparado conforme descrito no item 3.1.3, foi transferido para o centro das placas e essas, colocadas em câmara a 23^oC durante sete dias, quando foram efetuadas medições do diâmetro das colônias, em sentido perpendicular. Adotou-se o esquema fatorial com 9 isolados e 1 meio de cultura com cinco repetições, em delineamento inteiramente casualizado. O índice de crescimento micelial foi calculado pela fórmula modificada de Nakagava (1994):

$$\text{ICM} = \frac{C_1}{N_1} + \frac{C_2}{N_2} \dots + \frac{C_n}{N_n}$$

sendo:

ICM = índice de crescimento micelial

C_1 , C_2 , C_n = crescimento micelial das colônias na primeira, segunda e última avaliação.

N_1 , N_2 , N_n = número de dias

3.1.5.3 Descrição das colônias

Cultura monospórica de *Fusarium* sp. incubada em meio aveia-ágar durante sete dias a 23°C, com fotoperíodo de 12h/12h, foi observada sendo descrita sua coloração, tipo de micélio, tipo de colônia, formação de esporodóquios, escleródios e outros, conforme Booth (1971;1977)) e Nelson, Toussoun e Marosas (1983).

3.1.5.4 Comprimento das fiálides e formação dos conídios

As medições do comprimento das fiálides e as observações do modo da formação dos conídios foram realizadas através de microculturas no segundo dia. Foram efetuadas 10 medições das fiálides em microscópio ótico com objetiva 40x dotado de ocular micrométrica.

3.2 Estudo de variabilidade e patogenicidade de *Fusarium* sp. em gladiolo

Em ambos os experimentos de variabilidade e patogenicidade *in vivo*, foram comuns as seguintes etapas:

- os bulbos foram fornecidos pela Agrícola Schoenmaker de Wit Ltda, Holambra-SP;

- inicialmente retiraram-se as túnicas que recobriam os bulbos, com posterior desinfestação por 30 minutos em solução a 1% de NaCl contendo uma gota de Tween e, em seguida, foram mergulhados em três tempos em água estéril e, então, plantados;

- após a inoculação, foi posta uma cama de palha de arroz esterilizada para manutenção da umidade do solo e as plantas permaneceram 24 horas em câmara úmida. Durante todos os experimentos, as mesmas permaneceram protegidas com sombrite para evitar a ação direta do sol;

- o substrato utilizado para o desenvolvimento das plantas em casa de vegetação foi constituído de três partes de solo, uma de esterco de curral curtido e uma de areia lavada, e tratado com brometo de metila por 48 horas. O Quadro 1A representa a análise de fertilidade do solo realizada com o substrato utilizado nos experimentos. De acordo com os resultados da análise, fez-se correção da fertilidade com 0,10g de cloreto de potássio, 0,44g de superfosfato simples e 0,07g de uréia, segundo recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo (Tombolato, 1996);

- durante a condução dos experimentos foram realizadas inspeções periódicas, com anotações das alterações observadas, comparando-se com as plantas não inoculadas;

- para a avaliação dos resultados dos testes de variabilidade e patogenicidade, as plantas passaram por uma seleção, cujo objetivo foi verificar a porcentagem de plantas com sintomas de fusariose, sendo observadas visualmente e também através de corte transversal nos bulbos. Todas as folhas foram examinadas após a inoculação quando a(s) cultivar(es) apresentara(m) sintomas externos evidentes. Os sintomas externos e internos de severidade da doença foram avaliados por meio de uma escala de notas de 0 a 3, com 0, 1, 2, 3 representando, respectivamente, para os sintomas externos: nenhum sintoma visível; pouco crescimento, amarelecimento das extremidades foliares ou

folhagem curvada; amarelecimento geral das folhas, clorose severa e morte da planta) e para os sintomas internos: nenhuma podridão; ligeira descoloração no centro do bulbo e escurecimento dos vasos circundantes; descoloração generalizada de todo o conjunto do bulbo e necrose completa do bulbo). A escala de notas foi uma adaptação da avaliação realizada por Jones e Júnior (1975);

- após a avaliação, plantas doentes e sadias foram coletadas, embaladas, etiquetadas e levadas para análise. Em condições assépticas, na câmara de fluxo laminar, foram retirados fragmentos do tecido das folhas, raízes e bulbos, com dimensões de 5 x 5mm. Procedeu-se a desinfestação em álcool 70%, hipoclorito de sódio a 1% e lavagem em água destilada/estéril. Depois, foram plaqueados colocando-se cinco fragmentos por placas de 9,0cm com BDA e levados para incubar a $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante sete dias em regime de luz alternada. Cada tratamento foi constituído de quatro repetições e as placas foram dispostas em delineamento inteiramente casualizado;

- as análises estatísticas dos experimentos foram realizadas utilizando-se procedimentos não-paramétricos, pois as avaliações foram baseadas em características qualitativas através de notas. O teste de igualdade utilizado entre tratamentos foi o de Kruskal-Wallis, apropriado para esse tipo de delineamento (Campos, 1983). As análises foram feitas de acordo com o procedimento NPARIWAY, do software SAS (SAS[®]Institute, 1993). No caso em que o fator sob estudo era quantitativo (como altura da planta e diâmetro do bulbo), foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey.

3.2.1 Inoculação com discos de micélio no bulbo para teste de variabilidade

Bulbos da variedade White Friendship com (4,1-4,9cm) foram inoculados com discos de micélio de cinco isolados de *Fusarium oxysporum* e

quatro isolados de *Fusarium solani*. Depois de sete dias de incubação, sob alternância luminosa a 23°C, uma suspensão com uma média de $2,0 \times 10^6$ esporos/ml, representando aproximadamente 10 discos, foi preparada em água destilada/esterilizada, adicionando-se uma gota de Tween 80 (polioxietileno sorbitano monooleato) para melhor dispersão da massa conidiana. A concentração da suspensão foi avaliada em hemacitômetro (câmara de Newbauer) sob microscópio ótico.

A inoculação foi realizada após o 15º dia, colocando-se os discos no bulbo previamente ferido enquanto que na testemunha foram utilizados apenas discos de farinha de aveia. Adotou-se o delineamento estatístico inteiramente casualizado com onze repetições e uma planta por parcela.

3.2.2 Inoculação com ferimentos no bulbo para teste de patogenicidade

Conforme o nível de agressividade três isolados de *Fusarium oxysporum* e dois isolados de *Fusarium solani*, foram previamente selecionados no experimento anterior. A inoculação seguiu conforme o método modificado de Woltz (1974), na qual utilizou-se plantas das cultivares White Friendship (3,7cm) e Traderhorn (3,3-4,6cm) com 15 dias de desenvolvimento. Os bulbos foram feridos uniformemente na superfície com a ponta de uma agulha, originando ferimentos com 3mm de profundidade e formando um quadrado. Com auxílio de uma micropipeta, a inoculação consistiu na deposição de uma gota de 1,0µl da suspensão $1,0 \times 10^6$ conídios/ml sobre os ferimentos e no controle depositou-se uma gota de água destilada/esterilizada. O delineamento experimental usado foi inteiramente casualizado com cinco repetições e com duas plantas por parcela.

3.2.3 Métodos de inoculações *in vitro*

Foram inoculadas plantas da cultivar White Friendship, obtido *in vitro*, em meio de Murashige & Skoog (1962), acrescido de combinações de ANA, BAP e cinetina, sob condições de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas, que apresentavam o sistema radicular bem desenvolvido.

A concentração da suspensão de esporos dos isolados B-4I, B-4II, B-3III e V-1III produzidos em meio de farinha de aveia, após sete dias de incubação a 23°C , foi avaliada em hemacitômetro (câmara de Neubauer) sob microscópio ótico, procedendo-se as diluições e contagens até atingir-se o padrão adotado de 10^{10} , 10^6 e 10^4 conídios/ml.

Foram utilizados dois tipos de inoculação: no primeiro, os isolados de *Fusarium* sp. foram inoculados no momento da aclimatação. Com auxílio de uma pinça de ponta longa, as raízes das plântulas com 90 dias de crescimento foram mergulhadas em suspensão de esporos e levadas em seguida para tubos contendo vermiculita autoclavada.

O segundo tipo de inoculação foi realizado após duas semanas de permanência das plântulas obtidas *in vitro*, no substrato, sobre ele foi depositada com uma micropipeta, uma gota de $5\ \mu\text{l}$ de suspensão de esporos.

Cada tubo recebeu uma plântula que constituiu de uma repetição. Para cada testemunha foram utilizadas plântulas sob as mesmas condições, mas não inoculadas. Após a transferência das plântulas, os tubos foram vedados, colocados em suportes e incubados em sala de crescimento, sob luz complementar fornecida por 50% de lâmpadas grolux e 50% de lâmpadas fluorescentes luz branca, com fotoperíodo 12 horas de luz e 12 horas de escuro, a 26°C .

Os tubos de ensaio que apresentaram sinais de crescimento de microorganismos contaminantes e plântulas mortas foram descartados.

As avaliações foram realizadas ao 7^o, 14^o e 30^o dia após a inoculação, períodos que constituíram o ensaio experimental.

Apenas os sintomas externos das plântulas infectadas *in vitro* foram avaliados, utilizando-se a escala de 1 a 5, considerando-se patogênico o isolado que causou descoloração na parte aérea em qualquer nível em 50% das plantas inoculadas. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos e seis repetições e uma planta por parcela.

Através do plaqueamento em meio BDA de partes de tecidos das plântulas, confirmou-se a presença do fungo em questão.

A análise estatística foi feita utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis. Os tratamentos apresentavam-se arranjos com três fatores, neste caso, optou-se por desdobramento da interação (cada interação do fatorial passou a corresponder a um tratamento), porém, sem testar a significância da interação, em virtude de não existirem métodos não-paramétricos para a análise de ensaios fatoriais. Assim, uma vez ocorrendo significância entre tratamentos, teste de Kruskal-Wallis foi realizado entre médias de um fator, fixando níveis de um fator. As análises foram feitas de acordo com o procedimento NPAR1WAY, do software SAS (SAS[®] Institute, 1993).

3.3 Estabelecimento *in vitro* de gladiolo utilizando meristema

3.3.1 Limpeza e desinfestação do material

Os bulbos de gladiolos, variedade White Friendship, foram obtidos da FAEPE em Lavras, MG. Inicialmente passaram por uma pré-limpeza, em que foram retiradas as raízes e camadas da túnica que os recobriam, expondo as escamas (lâminas). Materiais com sintomas aparentes de infecção foram

eliminados. Posteriormente, os mesmos foram acondicionados em recipientes plásticos e submetidos a lavagem em água corrente, por 24 horas.

Em seguida, os bulbos foram imersos durante 20 minutos em álcool 70%, 30 minutos em solução de hipoclorito de sódio 30% e, em seguida, imersos durante 4 horas em uma solução de Benlate 0,1%, contendo duas a três gotas de Tween 20. Depois foram submetidos a tríplice lavagem em água destilada esterilizada, secagem e armazenagem por 3 semanas no escuro, para emissão das brotações.

3.3.2 Extração dos meristemas e condições de incubação

Os bulbos foram cortados em cubos contendo gemas apicais de aproximadamente 0,5 a 1,0cm³. Submeteu-se a desinfestação em etanol 70% por 1 minuto e, em seguida, foram imersos em solução de hipoclorito de sódio 2% durante 10 minutos e por 5 minutos em solução contendo 5ml de quemisetina e 5ml de terramicina. O material foi transferido para câmara de fluxo laminar, onde realizaram-se três lavagens em água destilada e esterilizada, para a retirada dos meristemas.

Os meristemas foram extraídos das gemas e transferidos para tubo de ensaio contendo 10ml do meio de cultivo. O material foi mantido por sete dias em escuro até o início do aparecimento de coloração esverdeada e então transferido para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz, intensidade luminosa de 425-490nm e temperatura de 26±1°C.

3.3.3 Preparo do meio de cultivo para meristema

O meio básico utilizado foi o de Murashige & Skoog (1962), acrescido de 3% de sacarose e 0,7% de ágar (Quadro 2A). Os tratamentos constituíram-se

de diferentes concentrações de benzinoaminopurina (BAP) e cinetina: 0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0mg/L combinados com ácido naftaleno acético (ANA) nas concentrações 0; 0,1 e 1,0mg/L.

O pH dos meios de cultura foi ajustado para 6,0 antes da autoclavagem, utilizando-se NaOH e/ou HCl em solução de 0,5N. O meio foi distribuído na quantidade de 10ml por tubo de ensaio e, em seguida, vedados com tampas plásticas. A autoclavagem foi realizada a 121^oC atm. de pressão, durante 20 minutos.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, usando-se dez repetições para cada tratamento. Após 90 dias procedeu-se a avaliação observando-se o número de brotações formadas por explante, altura das plântulas, número e comprimento das raízes e formação de bulbos e calos.

3.3.4 Subcultivo do material

O material foi subcultivado a cada 15 dias, separando-se as brotações e transferido-as para o meio descrito anteriormente.

3.3.5 Análise fitopatológica do material *in vitro*

Realizou-se periodicamente análise visual dos tubos de ensaio, procedendo-se a eliminação de material com qualquer sinal de contaminação.

Para análise fitopatológica retiraram-se fragmentos do tecido das folhas, com dimensões de 3 x 3mm das plântulas como amostras. Em condições assépticas, na câmara de fluxo laminar, procedeu-se à desinfestação em álcool 70%, hipoclorito de sódio a 1% e lavagem em água destilada/estéril. Depois foram plaqueados em BDA colocando-se cinco fragmentos por placas de 9,0cm e levados para incubar a 21±2^oC durante sete dias, em regime de luz alternada.

Cada tratamento foi constituído de quatro repetições e as placas foram dispostas em delineamento inteiramente casualizado.

A indexação do material serviu para confirmar a erradicação de *Fusarium* sp. através da limpeza clonal.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise fitossanitária dos bulbos, obtenção dos isolados, preparo do inóculo e identificação das espécies

4.1.1 Incidência de *Fusarium* sp. e outros patógenos sobre bulbos de gladiolo

Na Tabela 1 encontram-se os resultados do teste de sanidade a que foram submetidos os bulbos de gladiolo da FAEPE e da Schoenmaker. Esses valores indicaram que, quantitativamente, houve variação aparente entre a microflora fúngica observada em cada amostra. Apenas a amostra da área experimental da FAEPE apresentou incidência bastante alta de *Fusarium* sp., de 98,0%. Além da incidência de *Fusarium* sp., outro gênero fúngico foi detectado, com 5% de incidência. Trata-se da *Curvularia* sp., que também destaca-se entre gêneros de fungos patogênicos em gladiolo, conhecida como podridão de *Curvularia*, podridão do bulbo, mancha da haste e da flor. Segundo Pitta, Cardoso e Cardoso (1989) e Kucharek, Simone e Mullin (1978), esse microorganismo chega a causar, em alguns locais, maiores prejuízos do que a fusariose, é particularmente um parasita dos bulbos. Foi observado ainda a presença de *Penicillium* sp., fungo prejudicial no armazenamento.

TABELA 1. Incidência (%) dos gêneros de fungos detectados em bulbos de *Gladiolus x grandiflorus* L. pelo método de plaqueamento de fragmentos. UFLA, Lavras, MG, 1998.

Gênero de fungos	Incidência (%)	
	FAEPE ¹	Schoenmaker ²
<i>Fusarium</i> sp.	98,0	0,0
<i>Curvularia</i> sp.	5,0	0,0
<i>Penicillium</i> sp.	7,8	0,5

¹ Bulbos cultivados para obtenção de flores (pós-produção)

² Bulbos destinados aos produtores para plantio (pré-produção)

A identificação da espécie de *Fusarium* sp., baseou-se na descrição de Booth (1971;1977) e de Nelson, Toussoun e Marosas (1983), com base nos caracteres morfológicos.

Observou-se diferença acentuada no teste de sanidade dos bulbos utilizados nas referidas sub-amostras examinadas no presente trabalho, procedentes das diferentes situações de cultivo de gladiolo. A elevada porcentagem de incidência da doença na amostra da FAEPE, provavelmente decorre das distintas condições de acondicionamento do material e/ou plantios em áreas infestadas, surgindo, assim, focos de doença. Vale ressaltar que os bulbos da FAEPE são bulbos-filhos oriundos de plantio comercial da empresa Schoenmeker/Holambra/SP.

A disponibilidade de bulbos sadios de gladiolo, no mercado de bulbosas, isentos de *Fusarium*, principalmente, é um grave problema para os floricultores. Apesar da aparente boa qualidade, é difícil constatar a presença do patógeno apenas pela análise visual, pois o inóculo se mantém latente no material por vários meses, acarretando perdas nos plantios. Atualmente, sabe-se do risco que a doença oferece, pois se encontra amplamente disseminada nas regiões de

cultivo de gladiolo, incidindo sobre os bulbos das cultivares mais utilizados no comércio.

4.1.2 Identificação das espécies de *Fusarium* isoladas de bulbo de gladiolo

4.1.2.1 Morfologia de conídios

Na Tabela 2 encontra-se a análise qualitativa dos macroconídios. Os isolados apresentaram diferenças acentuadas na sua forma e extremidade, sendo levemente delgados em ambas as extremidades, geralmente curvados, quase cilíndricos no meio, relativamente finos, com célula basal pedicelada, parede fina, de um a quatro septos transversais, predominando três septos, raramente quatro, formados em pequenas fiálides simples ou ramificadas, geralmente após os microconídios, depois formados em esporodóquios. Apenas no isolado B-4I de *Fusarium solani* foram encontrados macroconídios com 4 septos.

Os microconídios apresentaram formas semelhantes, cilíndricos ou elipsóides ou ovalados, retos ou pouco curvados ou reniformes, constituindo-se em um abundante número na massa de esporos, observada nos diversos campos do microscópio. Encontravam-se em fiálides laterais simples e curtas (menores do que 14,0 μ m) ou em fiálides longas (menores do que 60,0 μ m), nunca formando cadeias e, na maioria, com uma única célula, raramente bicelulados. Nos isolados B-4, B-4I, B-4II e B-4III de *Fusarium solani*, os microconídios apresentaram um septo. Observou-se a formação de estruturas especializadas, como escleródios e clamidósporos.

TABELA 2. Características morfológicas qualitativas dos macroconídios de *Fusarium* sp. UFLA, Lavras, MG, 1998.

Espécie	Isolado	Forma	Extremidade
<i>Fusarium solani</i> (FS)	B-4	Subcilíndrica	Arredondada
	B-4I	Subcilíndrica	Arredondada
	B-4II	Subcilíndrica	Arredondada
	B-4III	Subcilíndrica	Arredondada
<i>Fusarium oxysporum</i> (FO)	B-3III	Fusiforme	Afilada
	B-5I	Fusiforme	Afilada
	B-7II	Fusiforme	Afilada
	B-8I	Fusiforme	Afilada
	V-1III	Fusiforme	Afilada

As letras B e V significam a origem dos isolados (híbrido branco e vermelho)

Os isolados B-4, B-4I, B-4II e B-4III, foram examinados em microculturas pela micologista Maria Menezes, da Universidade Federal Rural de Recife onde observou a formação de conidióforos longos, microconídios isolados ou em cabeças na extremidade do conidióforo, clamidósporos simples ou duplos, e, comprovou tratarem-se de características de *Fusarium solani*.

Segundo Massey (1926), macroconídios de FOG são um pouco atenuados em ambas as extremidades, quase cilíndricos no meio, um pouco pedicelados e geralmente curvados, com 0 a 7 septos, variando de 20,5 a 44µm de comprimento 3,2 a 4, 8µm de largura. Para os microconídios, em grande quantidade, predomina 0 septos, medem 9,0 a 11,0µm de comprimento e 7,0 a 10µm de largura, em massa conidiana branca e presença de escleródios e clamidósporos globosos e lisos, intercalares ou terminais em cultura pura, são características da espécie *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*.

Segundo a Tabela 3, existe variação nas dimensões dos conídios nos isolados de *F. oxysporum* e *F. solani*.

As dimensões dos conídios dos isolados produzidos em meio de farinha de aveia encontram-se na Tabela 3, onde se constata que os macroconídios de

Fusarium solani tiveram variação de 16,8 a 36,8 μ m x 2,4 a 5,5 μ m e os microconídios, de 4,0 a 13,9 μ m x 1,6 a 4,3 μ m.

Os macroconídios e os microconídios dos isolados de *Fusarium oxysporum* envolvidos no presente estudo, apresentaram dimensões de 18,1 a 32,9 μ m x 2,9 a 4,6 μ m e 5,0 a 8,3 μ m x 2,1 a 3,0 μ m, respectivamente.

TABELA 3. Dimensões de macroconídios e microconídios de isolados de *Fusarium* sp. Média de 50 repetições. UFLA, Lavras, MG, 1998.

Isolado	Macroconídios		Microconídios	
	Dimensões em μ m			
	Comp./Larg.	(s) ^o	Comp./Larg.	(s) ^o
B-4	16,8 x 2,4	2,3 x 1,2	5,3 x 1,7	2,3 x 0,9
B-4I	36,8 x 5,5	4,2 x 1,4	13,9 x 4,3	3,9 x 1,3
B-4II	23,9 x 3,6	1,5 x 1,0	4,7 x 1,6	2,1 x 0,5
B-4III	18,3 x 3,1	4,0 x 1,1	4,0 x 1,8	1,1 x 0,6
B-3III	18,1 x 4,6	5,8 x 1,7	5,9 x 2,2	2,6 x 0,9
B-5I	28,0 x 3,3	4,3 x 1,2	6,7 x 2,1	1,3 x 0,8
B-7II	27,8 x 3,5	6,7 x 0,9	8,3 x 2,4	1,2 x 0,9
B-8I	32,9 x 2,9	4,2 x 1,3	6,0 x 3,0	1,4 x 1,0
V-1III	27,8 x 3,3	7,3 x 0,8	5,0 x 2,4	1,2 x 0,4

As letras B e V significam a origem dos isolados (híbrido branco e vermelho) (s)^o desvio padrão

As características morfológicas apresentadas pelos macroconídios e microconídios dos isolados B-3III, B-5I, B-7II, B-8I e V-1III de *Fusarium oxysporum* estudados são bastantes próximas daquelas apresentadas por Massey (1926) para a identificação da espécie *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*. A divergência constante em quase todos os isolados relaciona-se à medida de comprimento e largura dos conídios que, em diversos casos, não atingiu a média descrita por Massey. Entretanto, considerada a influência do substrato e tempo de incubação sobre as dimensões dos conídios, admite-se enquadrar todos os

isolados de *Fusarium oxysporum* envolvidos no presente estudo como pertencentes à espécie *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*.

Dentre os autores que estudaram o gênero *Fusarium*, somente Snyder e Hansen, citados por Toussoun e Nelson (1976), não aceitaram as dimensões de conídios como critério taxonômico.

Além desse, outros aspectos morfológicos de *Fusarium oxysporum* Schlecht e *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. como taxa de crescimento, morfologia e pigmentação de colônias; tamanho, tipo das células conidiogênicas (fiálides), tipo de formação de conídios, foram considerados no presente trabalho, adotando-se a metodologia proposta pelos principais taxonomistas de *Fusarium*.

4.1.2.2 Crescimento radial do micélio

Os diâmetros médios, em centímetros, das colônias nos nove isolados selecionados podem ser observado na Tabela 4.

Tais valores dos variaram de 3,06 a 4,49cm, havendo diferença significativa entre eles. A média geral dos 54 diâmetros médios dos isolados foi de 2,17. Quanto ao tamanho dos diâmetros, os isolados B-5I e B-8I formaram as maiores colônias, enquanto os demais isolados se apresentaram em posição intermediária. Entretanto, as diferenças observadas não permitiram qualquer agrupamento dos isolados relacionados.

A taxa de crescimento micelial foi adotada por Booth (1971; 1977) como o primeiro item em sua chave dicotômica de separação de espécies de *Fusarium*. Essa chave separa as espécies que apresentam crescimento lento, com taxas abaixo de 2,5 ou 2,0cm de diâmetro após quatro dias, das demais. Dentre elas encontra-se *Fusarium oxysporum*, com taxas de crescimento acima daqueles valores, usualmente de 4,0 a 8,0cm. Os valores encontrados no presente trabalho referentes a *Fusarium oxysporum* variaram de 3,28 a 4,49cm de diâmetro a

pós quatro dias, com média geral de 4,17cm. Esses valores enquadram-se dentro daqueles estabelecidos para *Fusarium oxysporum*, de acordo com Booth (1971; 1977). Como foi observado, tal característica apresenta intensa variação de isolado para isolado, mesmo observando-se todos os cuidados recomendados na metodologia.


TABELA 4. Índice de crescimento micelial de colônias de *Fusarium* sp. após sete dias de desenvolvimento a 23°C em meio de farinha de aveia. Média de cinco repetições. UFLA, Lavras, MG, 1998.

Isolado	Repetição						Média
	I	II	III	IV	V	VI	
B-4	3,02	3,00	3,20	3,10	3,00	3,06	3,06 ^d
B-4I	3,55	3,40	3,35	3,34	3,32	3,41	3,39 ^c
B-4II	3,34	3,33	3,34	3,28	3,32	3,20	3,31 ^c
B-4III	3,36	3,40	3,20	3,12	3,38	3,60	3,34 ^c
B-3III	4,30	4,35	4,32	4,36	4,23	4,31	4,31 ^b
B-5I	4,68	4,43	4,40	4,38	4,51	4,56	4,49 ^a
B-7II	4,35	4,30	4,22	4,31	4,33	4,30	4,30 ^b
B-8I	4,55	4,53	4,53	4,34	4,51	4,50	4,49 ^a
V-1III	3,18	3,33	3,32	3,30	3,27	3,28	3,28 ^c

As letras B e V significam a origem dos isolados (híbrido branco e vermelho) Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, segundo teste de Tukey a 1% de probabilidade

4.1.2.3 Morfologia das colônias de *Fusarium* sp.

Após duas semanas com fotoperíodo de 12h/12h, os isolados não apresentaram variações acentuadas em relação a coloração das colônias. Os isolados de *Fusarium solani* apresentaram coloração salmão quase que na totalidade, e coloração violeta ou vinácea, que se intensificava e se difundia do centro da colônia para os isolados de *Fusarium oxysporum*, após algum tempo. O micélio aéreo apresentou coloração branca, plano, com bordos estriados e



intensa produção de microconídios, predominando ausência de septos para os isolados de *Fusarium oxysporum*. A presença de escleródios escuros (marrons) foi comum para as espécies em culturas com mais de 30 dias.

A coloração das colônias, utilizada primeiramente por Wollenweber como um dos parâmetros na identificação de espécies de *Fusarium*, também foi adotada por Gordan (1965), Messiaen e Cassini (1968), Booth (1971) e Gerlach (1977).

Observa-se, pela análise dos diferentes trabalhos consultados, que a variação na pigmentação é comum em uma espécie, mesmo em condições controladas. Cada forma especial pode apresentar pigmentações típicas com suas variações. Portanto, essa característica deve ser utilizada com cautela, como um parâmetro complementar, desde que observada as especificações metodológicas que cada autor estabelece.

4.1.2.4 Dimensões de clamidósporos e fiálides

Pelos resultados apresentados na Tabela 5 observa-se que não houve variação significativa na dimensão dos clamidósporos, os quais são geralmente abundantes, formados na hifa, de modo intercalar ou terminal ou em pares, pequenas cadeias, raramente em grupos. Apresentavam-se hialinos, geralmente globosos e com a parede lisa ou tosca.

Diversos autores utilizam o comprimento das fiálides como uma característica complementar para diferenciar *F. oxysporum* e *F. solani*.

Nirenberg (1981) separa as espécies *F. oxysporum* e *F. solani*, pelo comprimento dos conidióforos primários. *Fusarium oxysporum* apresenta conidióforos curtos, menores do que 20µm e *Fusarium solani* conidióforos longos, maiores do que 60µm.

Booth (1977) faz referência ao comprimento das fiálides, na descrição das espécies. O autor considera que *F. oxysporum* produz microconídios em fiálides curtas, sem se referir a sua dimensão, e que *F. solani* os produz em fiálides longas, com 45 a 80µm.

Houve diferença significativa entre os isolados das espécies quanto ao comprimento das fiálides. Conforme indica a Tabela 5, as fiálides laterais simples, produtoras de microconídios, apresentaram comprimento variando de 30,2 a 55,3µm e 10,1 a 13,9 para *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum*, respectivamente, enquadrando-se dentro das dimensões indicadas para *F. solani* e *F. oxysporum*

TABELA 5. Diâmetro dos clamidósporos e comprimento das fiálides de isolados de *Fusarium* sp. Os dados são médias de 10 repetições para clamidósporos e 20 para fiálides. UFLA, Lavras, MG, 1998.

Isolado	Clamidósporos		Fiálides	
	Diâmetro	Dimensões em µm (s)*	Comprimento	(s)*
B-4	6,9	0,3	48,4	1,1
B-4I	6,5	0,2	30,2	1,3
B-4II	5,5	0,5	43,8	1,0
B-4III	6,2	0,1	55,3	1,1
B-3III	6,7	0,2	10,1	0,5
B-5I	7,7	0,5	11,7	0,1
B-7II	7,2	0,4	11,5	0,3
B-8I	7,2	0,2	13,9	0,4
V-1III	7,9	0,2	11,6	0,5

As letras B e V significam a origem dos isolados (híbrido branco e vermelho)
(s)* desvio padrão

4.2 Estudo de variabilidade e patogenicidade de *Fusarium* sp. em gladfolo

4.2.1 Teste de variabilidade

Na Tabela 6 encontram-se os resultados obtidos no experimento de variabilidade dos isolados fúngicos, no qual avaliou-se, por meio de observações, o comportamento da cultivar White Friendship altamente, suscetível a isolados de *Fusarium*.

TABELA 6. Médias do índice de doença externo (IDE) e interno (IDI) em plantas do cv. White Friendship, inoculadas com *Fusarium* sp. UFLA, Lavras, MG, 1998.

Isolado	¹ Folha nova	¹ Folha velha	Altura planta	¹ Bulbo novo	² Diâmetro bulbo novo
B-4	53,81 ^{abc}	48,50 ^{ab}	79,80 ^a	38,81 ^{abcd}	4,55 ^{abc}
B-4I	49,27 ^{abc}	48,50 ^{ab}	80,26 ^a	61,81 ^{abcd}	4,64 ^{abc}
B-4II	34,54 ^{ab}	46,63 ^{ab}	75,33 ^a	81,09 ^d	4,33 ^c
B-4III	40,18 ^{abc}	44,77 ^{ab}	81,09 ^a	23,36 ^a	4,69 ^{abc}
B-3III	78,00 ^c	77,77 ^b	78,04 ^a	74,72 ^{cd}	4,46 ^{bc}
B-5I	65,90 ^{bc}	77,77 ^b	78,21 ^a	33,59 ^{abc}	4,58 ^{abc}
B-7II	81,00 ^c	73,59 ^b	82,33 ^a	71,54 ^{cd}	5,04 ^a
B-8I	76,45 ^c	77,27 ^b	78,40 ^a	68,77 ^{bcd}	4,29 ^c
V-1III	53,81 ^{abc}	52,68 ^b	86,21 ^a	74,04 ^{cd}	4,28 ^c

As letras B e V significam a origem dos isolados (híbrido branco e vermelho)

1 Valores de Qui-Quadrado calculados, conforme o critério de Kruskal-Wallis

2 Teste de Tukey 5% de probabilidade

Quanto aos resultados relacionados a variabilidade nas espécies de *Fusarium*, não foi constatado comportamento diferencial dos isolados diante da cultivar. Diferenças marcantes na reação da cultivar hospedeiro a uma série de isolados de forma especial de *Fusarium*, principalmente *F. oxysporum*, segundo Armstrong e Armstrong (1975), indicam tratar-se de genótipos diferentes para a

patogenicidade e devem ser considerados como raças. Para esses autores, o problema na separação de raças entre as formas especiais de *Fusarium oxysporum* é complexo e depende do critério e do cuidado do pesquisador em separá-las. Boas condições para a determinação de raças patogênicas são obtidas com isolados puros e estáveis do fungo, e linhas geneticamente puras do hospedeiro com cultivares apresentando diferenças em resistência, testadas sob condições ambientais estáveis.

Roebroek e Mes (1992) estudaram o relacionamento entre grupos de compatibilidade vegetativa e raças de *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* envolvendo 31 isolados e constataram que a relação é bastante complexa. Com base nas observações do teste de patogenicidade e inoculação *in vitro*, confirmaram os resultados obtidos. O comportamento dos isolados foi bastante homogêneo, principalmente em relação aos sintomas externos, não provocando diferenças marcantes na reação da planta. Para Armstrong e Armstrong (1975), o sintoma externo ocasionado por *Fusarium oxysporum* é o melhor critério para a avaliação de raças e tem sido utilizada a descoloração vascular para medir o grau de virulência ou severidade da doença. Em resumo, não se observou uma especificidade muito acentuada entre os isolados de *Fusarium*.

Os resultados do presente trabalho podem ter ocorrido em consequência da obtenção do inóculo, ou obtenção de material da mesma procedência ou ainda devido à metodologia de inoculação. Pelo que pôde-se observar, o tempo inicial do aparecimento dos sintomas foi de aproximadamente 60 dias após a inoculação, admitindo-se também, a hipótese de que como nas semanas da condução do experimento, como mostra o Quadro 3A, a temperatura permaneceu baixa, tais condições podem ter interferido no desenvolvimento do patógeno.

4.2.2 Teste de patogenicidade

Apesar do tipo de inoculação utilizado (cortes no bulbo) considerada uma inoculação drástica, observou-se nos testes de patogenicidade das cultivares White Friendship e Traderhom que todos os isolados testados foram patogênicos, porém, com diferentes graus de patogenicidade. Os sintomas observados foram semelhantes àqueles produzidos em condições naturais, ocorrendo lesão na parte central do bulbo e escurecimento dos vasos circundantes. Lesões nas raízes próximas do bulbo foram encontradas. Gould (1949) descreve que nesse local, as raízes estão em contato com tecidos mortos infectados. Sob condições de baixa temperatura, FOG parece ser capaz de existir na superfície de tecidos mortos e senescentes, e sem causar grandes prejuízos.

Entretanto, os isolados de *Fusarium solani* não atingiram níveis tão severos quanto os observados quando se inoculou com os isolados de *Fusarium oxysporum*.

De acordo com a análise de variância dos resultados do ensaio de patogenicidade, houve variação significativa entre os diferentes isolados testados em ambas as cultivares. Os isolados: B-4I, B-4II, B-3III, B-5I e V-1III foram selecionados por causarem sintomas típicos e evidentes e pela virulência no teste anterior. Esta seleção visou reduzir o número de isolados com o objetivo de facilitar os trabalhos seguintes.

Os isolados testados na cultivar White Friendship apresentaram diversos graus de patogenicidade, conforme as médias relacionadas na Tabela 7. A cultivar mostrou-se mais suscetível ao isolado V-1III de *Fusarium oxysporum*, apresentando sintomas típicos nas folhas velhas e novas, altura das plantas e bulbo novo. O isolado B-4II de *Fusarium solani* apresentou um nível razoável de agressividade, observando-se os sintomas apenas nas folhas velhas e bulbo novo.

TABELA 7. Valores médios do índice de doença externo e interno em plantas do cv. White Friendship inoculadas com *Fusarium* sp. UFLA, Lavras, MG, 1998.

Isolado	¹ Folha nova	¹ Folha velha	² Altura planta	¹ Bulbo novo	² Diâmetro bulbo novo
B-4I	07,50 ^a	06,70 ^a	74,22 ^{ab}	06,00 ^a	4,18 ^b
B-4II	10,30 ^a	13,50 ^{ab}	74,86 ^{ab}	12,00 ^{ab}	4,24 ^b
B-3III	21,50 ^a	23,30 ^b	61,68 ^a	26,50 ^b	2,92 ^a
B-5I	23,10 ^a	20,70 ^{ab}	62,74 ^a	20,50 ^{ab}	3,22 ^a
V-1III	23,10 ^a	23,80 ^b	66,70 ^a	22,00 ^b	3,16 ^a

As letras B e V significam a origem dos isolados (híbrido branco e vermelho)

1 Valores de Qui-Quadrado calculados, conforme o critério de Kruskal-Wallis

2 Teste de Tukey 5% de probabilidade

Os resultados apresentados evidenciaram a existência de diferentes graus de suscetibilidade à infecção por *Fusarium* sp. das cultivares, ficando demonstrada a importância da presença do ferimento para a infecção do bulbo.

Na Tabela 8, os isolados B-3III e B-4II testados na cultivar Traderhorn foram os que mostraram-se patogênicos. Ambos apresentaram sintomas na folha velha, no bulbo e ocasionaram alterações no diâmetro do bulbo. Além disso, ficou evidente nas cultivares testados uma interação entre bulbo e folha velha, reflexo da alta incidência de *Fusarium* sp. no bulbo. Nas duas cultivares envolvidas no ensaio ficou demonstrada a importância de ferimentos no bulbo devido ao tempo de surgimento dos sintomas da doença ter sido significativamente menor (30 dias), se comparado a inoculação com discos de micélio (60 dias). As condições climáticas observadas durante a condução dos experimentos na casa de vegetação podem ter influenciado significativamente no desenvolvimento do patógeno, pois as condições de temperatura e umidade encontravam-se adequadas.

TABELA 8. Valores médios do índice de doença externo e interno do cv. Traderhorn, inoculado com *Fusarium* sp. UFLA, Lavras, MG, 1998.

Isolado	¹ Folha nova	¹ Folha velha	² Altura planta	¹ Bulbo novo	² Diâmetro bulbo novo
B-4I	07,50 ^a	06,50 ^a	79,34 ^{ab}	06,50 ^a	4,40 ^b
B-4II	16,50 ^a	14,30 ^{ab}	77,54 ^{ab}	12,50 ^{ab}	4,46 ^b
B-3III	22,50 ^a	26,70 ^b	71,76 ^a	25,50 ^b	3,74 ^a
B-5I	22,50 ^a	19,50 ^{ab}	72,56 ^a	21,90 ^{ab}	4,16 ^{ab}
V-1III	16,50 ^a	19,50 ^{ab}	72,46 ^a	20,10 ^{ab}	4,08 ^{ab}

As letras B e V significam a origem dos isolados (híbrido branco e vermelho)

1 Valores de Qui-Quadrado calculados, conforme o critério de Kruskal-Wallis

2 Teste de Tukey 5% de probabilidade

Variações nas reações de suscetibilidade e resistência das cultivares de gladiolo para podridão do bulbo têm sido relatadas por vários autores. Nas condições em que os ensaios foram realizados não se verificaram diferenças estatísticas entre as cultivares quando foram analisados os sintomas nas folhas novas.

Nos ensaios com esses isolados de *Fusarium* pôde ser observado que realmente a inoculação provocou alterações no desenvolvimento das plantas, mas outros dados devem ser obtidos para que se ter conclusões mais objetivas, principalmente com o uso de outras cultivares e analisando-se a produção final das plantas.

Os resultados mostraram-se favoráveis por apresentar um rápido desenvolvimento da doença incluindo: a máxima exposição do bulbo a inoculação, por apresentar uma abertura necessária como via de entrada para o fungo e favorecer o seu crescimento, sem inibir o desenvolvimento da planta. Esses resultados não diferem dos relatados por Woltz e Magie (1973) quando testaram a patogenicidade de seis isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*

em cinco cultivares de gladiolo. Utilizando essa mesma metodologia de inoculação, Woltz (1974) constatou a suscetibilidade de quatro cultivares de gladiolo ao potencial de inóculo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*.

Os resultados são muito variáveis quando comparados com outros trabalhos semelhantes, uma vez que envolvem metodologia modificada, espécies vegetais e condução de experimentos diferentes.

4.2.3 Avaliação de metodologias de inoculação *in vitro*

Os resultados deste experimento estão apresentados nas Tabelas 9, 10, 11. Houve diferença significativa entre os métodos, porém a inoculação com imersão de raízes em suspensão de conídios não apresentou significância.

A cultivar apresentou ao sétimo dia de inoculação sintomas externos evidentes quando inoculado com isolados de *Fusarium solani*, com a incorporação de suspensão de inóculo 10^{10} conídios/ml ao substrato, não ocorrendo o mesmo quando as raízes foram imersas na suspensão de conídios. Tal fato pode ter sido ocasionado pelo tempo decorrido entre a aclimação e a inoculação, ressaltando-se não ter sido acrescido qualquer nutriente ao substrato para não proporcionar nenhuma alteração no desenvolvimento do inóculo em curto espaço de tempo e, conseqüentemente, provocar interferências nos resultados. Observou-se que, no dia seguinte à inoculação, ocorreu desenvolvimento elevado do crescimento das colônias do fungo. Apenas o isolado V-1III de *Fusarium oxysporum* apresentou sintomas evidentes nas folhas com bordos ligeiramente amarelados, a partir da concentração inicial de 10^4 , quando o inóculo foi adicionado ao substrato.

TABELA 9. Médias do grau de infecção (na severidade da doença *in vitro*) na cultivar White Friendship, para diferentes concentrações de inóculo de *Fusarium* sp. UFLA, Lavras, MG, 1999.

Isolado	Grau de infecção 7 dias após a inoculação					
	Inoculação com imersão de raízes em suspensão de conídios			Inoculação no substrato com suspensão de conídios		
	10 ⁴	10 ⁶	10 ¹⁰	10 ⁴	10 ⁶	10 ¹⁰
B-4I	60,5	60,5	60,5	42,5	42,5	159,5
B-4II	60,5	60,5	60,5	42,5	159,5	159,5
B-5I	169,0	169,0	169,0	42,5	159,5	159,5
V-1III	169,0	169,0	169,0	159,5	159,5	159,5
B-3III	169,0	169,0	169,0	42,5	159,5	159,5

As letras B e V significam a origem dos isolados (híbrido branco e vermelho)
Os dados são médias de seis repetições
Valores calculados conforme o critério de Kruskal-Wallis

TABELA 10. Média da grau de infecção (na severidade da doença *in vitro*) na cultivar White Friendship, para diferentes concentrações de inóculo de *Fusarium* sp. UFLA, Lavras, MG, 1999.

Isolado	Grau de infecção 14 dias após a inoculação					
	Inoculação com imersão de raízes em suspensão de conídios			Inoculação no substrato com suspensão de conídios		
	10 ⁴	10 ⁶	10 ¹⁰	10 ⁴	10 ⁶	10 ¹⁰
B-4I	60,5	60,5	271,0	159,5	159,5	159,5
B-4II	60,5	60,5	169,0	159,5	159,5	159,5
B-5I	169,0	169,0	254,0	159,5	159,5	159,5
V-1III	169,0	169,0	271,0	159,5	159,5	159,5
B-3III	169,0	169,0	271,0	159,5	159,5	159,5

As letras B e V significam a origem dos isolados (híbrido branco e vermelho)
Os dados são médias de seis repetições
Valores calculados conforme o critério de Kruskal-Wallis

TABELA 11. Médias do grau de infecção (na severidade da doença *in vitro*) na cultivar White Friendship, para diferentes concentrações de inóculo de *Fusarium* sp. UFLA, Lavras, MG, 1999.

Isolado	Grau de infecção 30 dias após a inoculação					
	Inoculação com imersão de raízes em suspensão de conídios			Inoculação no substrato com suspensão de conídios		
	10 ⁴	10 ⁶	10 ¹⁰	10 ⁴	10 ⁶	10 ¹⁰
B-4I	271,0	271,0	271,0	279,5	279,5	279,5
B-4II	271,0	271,0	271,0	279,5	279,5	279,5
B-5I	271,0	271,0	271,0	279,5	279,5	279,5
V-1III	271,0	271,0	271,0	279,5	279,5	279,5
B-3III	271,0	271,0	271,0	279,5	279,5	279,5

As letras B e V significam a origem dos isolados (híbrido branco e vermelho)
 Os dados são médias de seis repetições
 Valores calculados conforme o critério de Kruskal-Wallis

Na cultivar White Friendship todos os métodos de inoculação apresentaram elevado grau de infecção. Através desse estudo, observou-se que o método de inoculação de imersão de raízes de plântulas com 90 dias de crescimento, na concentração de inóculo 10¹⁰ conídios/ml, expressou maior agressividade dos isolados de *Fusarium oxysporum* provocando a morte das plantas a partir do décimo quinto dia da inoculação. Os isolados de *Fusarium solani* foram menos agressivos nessas condições para as plantas não-aclimatadas da cultivar.

Foram observadas, na avaliação aos 30 dias após a inoculação, raízes primárias atrofiadas apresentando sintomas evidentes, com o sistema radicular completamente escuro. Provavelmente que nesses locais, o fungo tenha penetrado por algum ferimento ocorrido no momento do transplântio ou pela ruptura de radículas que deixariam os vasos expostos no momento da aclimação. O maior índice de doença encontrado em um espaço de tempo menor nas plantas inoculadas por imersão das raízes pode ser explicado pelo

maior contato da superfície radicular com as estruturas infectivas do patógeno, possibilitando maior penetração do fungo.

Foram comuns para as duas metodologias de inoculação os sintomas externos. Observou-se inicialmente a redução do crescimento das plantas seguidas do amarelecimento das folhas basais que generalizou-se necrose dos bordos folheares, ocorrendo nesta fase a morte da parte apical, progredindo até causar a morte da planta. Em qualquer dessas fases não ocorreu queda das folhas.

Uma das dificuldades encontradas no estudo de patogenicidade de *Fusarium* sp. em gladiolo é dispor de um método de inoculação que proporcione resultados satisfatórios em breve espaço de tempo. É importante ressaltar que testes preliminares para o estabelecimento da metodologia, foram feitos. Plantas jovens foram inoculadas com pedaços de discos de micélio de aproximadamente 1mm, que foram colocados sobre o bulbo das mesmas, que era elevado até a superfície, mantendo-se apenas o sistema radicular imerso no meio de cultura. Como o bulbo das plantas já apresentava meio de cultivo, após três dias já havia colonização total, causando na planta sintomas atípicos e muito severos. Resultados semelhantes foram obtidos por Júnior (1985) em cultivares de videira, essas plantas, após a inoculação, eram postas em tubos de cultura onde ficavam tutoradas por meio de um suporte de papel de filtro que mantinha o sistema radicular imerso no meio líquido, porém, as plantas já vinham com inóculo na superfície do sistema radicular, favorecendo então a colonização total do meio e do suporte. Após a substituição do meio sólido por vermiculita autoclavada, observou-se que os sintomas se iniciavam cerca de sete dias após a inoculação e eram característicos em ambas as técnicas de inoculação. Em virtude das condições favoráveis ao desenvolvimento da doença, após aproximadamente 15 dias, notou-se que começaram a surgir os sintomas

severos, o que ocorreu em casa de vegetação, porém em período longo (aproximadamente 30 ou 60 dias dependendo do experimento).

4.3 Estabelecimento *in vitro* de gladiolo a partir de cultura de meristemas

4.3.1 Tratamento de bulbos de gladiolos

A imersão em solução de Benlate tornou viável o armazenamento de bulbos em bandejas plásticas com ausência total de contaminação fúngica. Esse não aparecimento de massa fúngica se deve ao acondicionamento em bandejas, que diminui o calor e a umidade, impedindo o desenvolvimento dos fungos sobre os bulbos, viabilizando-os para a produção de gemas.

Cerca de 12 dias depois, 80% dos bulbos tratados apresentavam gemas, alguns até antes desse período, enquanto outros só as desenvolveram aos 20 dias de armazenamento.

4.3.2 Efeito dos reguladores de crescimento BAP, cinetina e ANA sobre o estabelecimento *in vitro* de gemas apicais de gladiolo

A cultivar White Friendship com 98% de incidência de *Fusarium* sp. mostrou tendência a se estabelecer, devido ao desenvolvimento diferencial das gemas apicais, em função dos diferentes reguladores testados. A cultivar não comportou-se de forma similar nas doses utilizadas da interação dos fitorreguladores. Melhores respostas foram observadas com os reguladores BAP e ANA apresentando efeito significativo no desenvolvimento das plantas (número e tamanho de brotos e tamanho de raízes). Entretanto, a interação desses reguladores não mostrou significância no número de raízes formadas, mostrando que os reguladores de crescimento agem isoladamente. A adição de

cinetina e ANA em meios MS em várias concentrações apresentou diferenças ocasionadas pelo uso combinado dos dois reguladores de crescimento afetando o número e tamanho de brotos e o tamanho de raízes formadas. Apenas o número de raízes foi favorecido pela interação (Tabelas 3 e 4 A).

Não foi observada ocorrência de calogênese nos explantes, independente do tratamento aplicado. Outro aspecto observado foi a formação de bulbos. Bulbos foram induzidos na base das plantas sendo a presença de BAP no meio de cultura fundamental. O tratamento em meio de cultura suplementado com a concentração de 4,0mg/L de BAP apresentou a formação de três bulbos. Em meios sem BAP, observou-se a formação de pequenos bulbos na presença de ANA.

4.3.3 Efeito dos reguladores de crescimento BAP e cinetina sobre a multiplicação *in vitro* de gemas apicais de gladiolo, var. White Friendship

As citocininas utilizadas foram efetivas na formação de brotos, como pode ser observado nas Tabelas 12 e 13. O número de brotos formados foi pequeno (variando de 1 a 3 brotos/explantes), mesmo utilizando concentrações elevadas.

Pelos resultados apresentados na Tabela 12, observa-se que houve tendência de redução no número de brotos formados com aumento do nível de ANA, ocorrendo 3,32 brotos, em média, no meio em que se utilizou apenas BAP na concentração 0,5mg/L.

Houve uma incidência maior de multiplicação, quando foi adicionado 0,5mg/L de BAP ao meio MS na ausência completa de ANA, o que resultou na produção um número maior de brotos do que nos demais tratamentos.

TABELA 12. Número médio de brotos formados em gladiolo cultivado *in vitro*, em diferentes concentrações de BAP e ANA adicionadas ao meio de cultura. UFLA, Lavras, MG, 1998.

ANA mg/L	BAP mg/L				
	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0
0,0	3,118 ^{AA}	3,322 ^{AA}	2,322 ^{AB}	2,166 ^{AB}	1,804 ^{BB}
0,1	3,142 ^{AA}	3,090 ^{AA}	0,710 ^{BC}	2,248 ^{AB}	2,336 ^{BA}
1,0	0,710 ^{BB}	0,710 ^{BB}	2,218 ^{AA}	2,044 ^{AA}	2,102 ^{abA}

Médias seguidas de mesma letra maiúscula (BAP e/ou cinetina) ou minúscula (ANA) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

Avaliando o comportamento da gema de gladiolo cultivada em meio MS em diferentes concentrações de cinetina e ANA (Tabela 13), pode-se observar uma produção de aproximadamente 3,90 brotos por explante nos tratamentos em que não foram adicionados cinetina e na concentração de 1,0mg/L de ANA. Verificou-se que a produção de brotos foi constante até a concentração de 1mg/L de cinetina, independente da concentração de ANA utilizada.

TABELA 13. Número médio dos brotos formados em gladiolo cultivado *in vitro*, em diferentes concentrações de cinetina e ANA adicionadas ao meio de cultura. UFLA, Lavras, MG, 1998.

ANA mg/L	Cinetina mg/L				
	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0
0,0	3,100 ^{BA}	3,060 ^{AA}	2,760 ^{AA}	2,936 ^{AA}	2,354 ^{AA}
0,1	3,044 ^{BA}	2,858 ^{AA}	2,768 ^{AA}	0,171 ^{BC}	1,854 ^{AB}
1,0	3,900 ^{AA}	2,094 ^{BB}	1,900 ^{BB}	2,570 ^{AB}	0,710 ^{BC}

Médias seguidas de mesma letra maiúscula (BAP e/ou cinetina) ou minúscula (ANA) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

O uso de concentrações elevadas de reguladores de crescimento não proporcionou acréscimo no número de brotos obtidos. A indução de brotações *in vitro* ocorre pelo desequilíbrio hormonal induzido por uma concentração

adequada e balanceada de reguladores de crescimento adicionados ao meio. A resposta a esse processo depende de fatores inerentes à planta.

A eficiência das citocininas, que têm a função primordial na divisão celular, desempenhando importante papel na indução de brotos, é dependente então da presença de “proteínas ligantes” em quantidade e especificidade satisfatórias para promover respostas desejáveis. Isso sugere que a ausência de respostas positivas para o cultivar White Friendship, mediante a indução de citocininas pode ser devido à ausência destas “proteínas ligantes” específicas ou à presença dessas em quantidades limitantes para proporcionar respostas desejáveis, como a proliferação dos brotos.

O tamanho de brotos formados, conforme se observa nas Tabelas 14 e 15, foi influenciado pelas concentrações elevadas de citocininas e ANA. Hussey (1977) afirma que a adição de ANA ao meio de cultura inibe o crescimento dos brotos de gladiolo.

Como se observa na Tabela 14, brotos de maior tamanho, com melhor desenvolvimento da parte aérea e com aspecto saudável foram obtidos em meios sem reguladores de crescimento, tendo atingido uma média de altura 18,18cm.

TABELA 14. Comprimento médio dos brotos formados em gladiolo cultivado *in vitro*, em diferentes concentrações de BAP e ANA adicionadas ao meio de cultura. UFLA, Lavras, MG, 1998.

ANA mg/L	BAP mg/L				
	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0
0,0	18,180 ^{1A}	15,820 ^{2A}	8,840 ^{3A}	8,000 ^{2B}	7,320 ^{2B}
0,1	13,780 ^{3A}	13,740 ^{3A}	0,000 ^{3C}	8,760 ^{1AB}	6,400 ^{2B}
1,0	0,000 ^{3B}	0,000 ^{3B}	6,400 ^{2A}	5,060 ^{2A}	5,980 ^{2A}

Médias seguidas de mesma letra maiúscula (BAP e/ou cinetina) ou minúscula (ANA) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

No experimento com cinetina, plantas com maior tamanho de brotos foram obtidas em tratamentos com ausência de cinetina e ANA. Plantas que foram cultivadas em meio MS com 4,0mg/L de cinetina e 1,0mg/L de ANA, não apresentaram desenvolvimento da parte aérea (Tabela 15).

TABELA 15. Comprimento médio dos brotos formados em gladiolo cultivado *in vitro*, em diferentes concentrações de cinetina e ANA adicionadas ao meio de cultura. UFLA, Lavras, MG, 1998.

ANA mg/L	Cinetina mg/L				
	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0
0,0	15,680 ^{2A}	12,020 ^{2AB}	11,020 ^{2AB}	7,140 ^{2AB}	5,280 ^{2B}
0,1	12,320 ^{2bA}	10,280 ^{2A}	10,560 ^{2A}	0,000 ^{2bC}	5,820 ^{2B}
1,0	9,400 ^{2AB}	11,840 ^{2A}	8,700 ^{2AB}	5,900 ^{2bB}	0,000 ^{2bC}

Médias seguidas de mesma letra maiúscula (BAP e/ou cinetina) ou minúscula (ANA) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

A adição ao meio de cultura de BAP e cinetina, em concentração igual ou superior a 1mg/L, induziu a formação de tufos. Leshen et al. (1988) também observaram formação de tufos, bem como um fenômeno de vitrificação em plantas de crisântemo e melão, devido à utilização de dosagens elevadas de BAP. Trabalhando com *Castanea mollesima*, Qiguang et al. (1986) constataram que o excesso de BAP, além de reduzir muito a parte aérea, promoveu a formação de calos nas bases dos explantes.

Como já foi observado nas Tabelas 12 e 13, em meios com menor concentração de citocininas ocorreu menor número de brotos, entretanto, em brotos de maior tamanho foi possível a obtenção de maior número de segmentos nodais, utilizando para subcultivo. Em segmentos nodais que produzem maior número de brotos, esses apresentam menor tamanho, o contrário, de onde se obteve a formação de um único broto, este apresentou maior desenvolvimento. Diante dessas observações, não se pode afirmar a efetividade do regulador

cinetina correlacionado ao tamanho dos brotos, onde apresentou o tamanho próximo a 15cm.

Pode-se observar que o cultivar *White Friendship*, comportou-se como se no meio de cultura ainda existissem resíduos de citocininas, mas ao que tudo indica, deve haver uma produção endógena de citocininas que proporcionam essa multiplicação independente.

4.3.4 Efeito dos reguladores de crescimento BAP e cinetina sobre o enraizamento de explantes de gladiolo, var. *White Friendship*

Com relação à formação de raízes a cultivar *White Friendship* respondeu positivamente ao efeito da auxina, ocorrendo maior número de raízes nos tratamentos com 0,0 ou 0,1mg/L de ANA. Nas Tabelas 16 e 17, observa-se que o aumento das concentrações de citocininas afetou o número de raízes formadas, apresentando resultados melhores nos tratamentos com ausência e 0,5mg/L de citocininas. As raízes foram inibidas a medida que se aumentou as concentrações de citocininas.

Como mostra a Tabela 16, melhor indução de raízes ocorreu nos explantes cultivados em meio sem os reguladores de crescimento ANA e BAP (3,78/explantes). Resultados semelhantes foram obtidos por Hussey (1977), que observou, a inibição do crescimento das raízes de gladiolo em elevadas concentrações de BAP, tornando-as pequenas e grossas. As concentrações de ANA também afetaram o enraizamento dos brotos, o qual foi diminuindo a medida que se aumentaram os níveis testados.

TABELA 16. Número médio de raízes formadas em gladiolo cultivado *in vitro*, em diferentes concentrações de BAP e ANA adicionadas ao meio de cultura. UFLA, Lavras, MG, 1998.

ANA mg/L	BAP mg/L				
	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0
0,0	3,778 ^{aA}	2,426 ^{aB}	1,326 ^{aAB}	1,688 ^{aAB}	0,884 ^{aB}
0,1	2,852 ^{aA}	1,636 ^{aB}	1,348 ^{aB}	1,566 ^{aB}	1,348 ^{aB}
1,0	0,710 ^{bB}	2,346 ^{aA}	0,812 ^{bB}	0,884 ^{bB}	0,710 ^{bC}

Médias seguidas de mesma letra maiúscula (BAP e/ou cinetina) ou minúscula (ANA) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

Em meios com concentrações mais elevadas de cinetina, acima de 1,0mg/L, a formação de raízes foi afetada. O maior número de raízes foi observado em meios em que se utilizou 0,5mg/L de cinetina e 0,1mg/L de ANA. Ao contrário do que se observou em meios com BAP, no meio de cultura que fora acrescido com cinetina, o número de raízes não foi afetado pela elevação dos níveis de ANA, como mostra a Tabela 17. O número de raízes apresentou-se constante, apesar de ter ocorrido menor formação em meios com 0,1mg/L de ANA.

TABELA 17. Número médio de raízes formadas em gladiolo cultivado *in vitro*, em diferentes concentrações de cinetina e ANA adicionadas ao meio de cultura. UFLA, Lavras, MG, 1998.

ANA mg/L	Cinetina mg/L				
	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0
0,0	3,182 ^{aA}	2,472 ^{bB}	2,468 ^{aAB}	2,200 ^{aAB}	1,320 ^{aB}
0,1	2,054 ^{aAB}	3,386 ^{aA}	2,422 ^{aA}	0,710 ^{bB}	0,992 ^{aB}
1,0	3,142 ^{aA}	2,066 ^{bAB}	0,986 ^{bB}	3,210 ^{aA}	1,078 ^{aB}

Médias seguidas de mesma letra maiúscula (BAP e/ou cinetina) ou minúscula (ANA) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

A cinetina foi menos efetiva no comprimento de raízes (1,52cm) em comparação com BAP, que apresentou um comprimento de 1,90cm. De maneira geral, a adição de BAP não determinou a redução no comprimento das raízes. Os melhores resultados foram observados quando ao meio MS foi adicionado 2,0mg/L de BAP na ausência da auxina. Quando avaliou-se o comprimento das raízes observou-se um decréscimo de crescimento, provenientes de meio com adição do regulador ANA. Esta concentração 1,0mg/L, inibiu o desenvolvimento de raízes nos meios que continham BAP (Tabela 18).. Isto se deve, a existência de duas fases de formação de raízes adventícias, a primeira é a fase de iniciação radicular, quando a exposição à auxina é essencial; na segunda fase, de emergência e desenvolvimento radicular, a auxina não é requerida ou é até mesmo inibitória. Esses resultados obtidos, demonstra a importância da exposição dos explantes à auxina na fase inicial de enraizamento e a necessidade de transferência desses explantes para meio livre de auxina na fase de desenvolvimento radicular. De acordo com Drew (1991), por causa da dificuldade e custo de transferência dos brotos para meios sem auxina, em cultura de tecidos comercial os brotos são usualmente deixados em meio contendo auxina por 3 a 4 semanas, com conseqüente prejuízo para a morfologia e alongamento de raízes.

TABELA 18. Comprimento médio de raízes formadas em gladiolo cultivado *in vitro*, em diferentes concentrações BAP e ANA adicionadas ao meio de cultura. UFLA, Lavras, MG, 1998.

ANA mg/L	BAP mg/L				
	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0
0,0	1,120 ^{abAB}	1,300 ^{abAB}	0,480 ^{aAB}	1,900 ^{aA}	0,000 ^{bb}
0,1	1,360 ^{aA}	0,740 ^{ab}	0,280 ^{aAB}	1,440 ^{abA}	1,240 ^{aA}
1,0	0,000 ^{bb}	1,380 ^{aA}	0,400 ^{aAB}	0,540 ^{bab}	0,640 ^{abAB}

Médias seguidas de mesma letra maiúscula (BAP e/ou cinetina) ou minúscula (ANA) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

O aumento da concentração de cinetina ao meio induziu a redução no comprimento das raízes, portanto o tratamento com maior índice de crescimento das raízes ocorreu em meios de cultivo com 0,1mg/L da ANA e ausência de cinetina. As concentrações de ANA utilizadas não interferiram também no tamanho das raízes (Tabela 19).

TABELA 19. Comprimento médio de raízes formadas em gladiolo cultivado *in vitro*, em diferentes concentrações de cinetina e ANA adicionadas ao meio de cultura. UFPA, Lavras, MG, 1998.

ANA mg/L	Cinetina mg/L				
	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0
0,0	1,320 ^{2A}	1,400 ^{2A}	0,920 ^{2A}	1,290 ^{2A}	0,860 ^{2A}
0,1	1,520 ^{2A}	0,940 ^{2AB}	1,160 ^{2A}	0,000 ^{2B}	0,180 ^{2AB}
1,0	1,400 ^{2A}	1,140 ^{2AB}	0,360 ^{2B}	1,080 ^{2AB}	0,340 ^{2B}

Médias seguidas de mesma letra maiúscula (BAP e/ou cinetina) ou minúscula (ANA) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

4.3.5 Análise da sanidade das plântulas micropropagadas

Alguns tubos apresentaram proliferação de fungos e bactérias e foram descartados. Kunneman e Albers, citados por Hol e van der Linde (1992), confirmam altas taxas de contaminação *in vitro* com os materiais que são oriundos do solo, tais como bulbos, bulbos, rizomas e estolões. A avaliação final foi feita através da indexação para quantificar a incidência de espécies de *Fusarium*, realizada principalmente pelo teste de plaqueamento de fragmentos de tecidos das plantas de gladiolo. Os resultados mostraram que a incidência de *Fusarium* sp., durante todas as fases desse tipo de cultivo, foi de 0% nas plantas analisadas, não havendo a confirmação de infecção com o patógeno. Conforme o esperado, a técnica de limpeza clonal foi preponderante no cultivo de gladiolo, apresentando plântulas de alta qualidade com relação ao aspecto fitossanitário,

podendo-se constatar a ausência completa de microrganismos, principalmente de espécies de *Fusarium*.

Apesar das limitações de trabalhos referindo-se a obtenção de plantas livres de *Fusarium* através de cultura de meristemas, foi possível constatar a efetividade da técnica.

5 CONCLUSÕES

- ◆ Necessidade de um manejo mais adequado de pós-colheita dos bulbos, em consequência da situação fitossanitária dos mesmos, em relação a *Fusarium*.
- ◆ Os caracteres morfológicos utilizados revelaram resultados satisfatórios para a identificação de espécies de *Fusarium* e o meio de farinha de aveia e a temperatura a 23^o proporcionaram condições favoráveis para a produção de conídios.
- ◆ Frente aos isolados utilizados no teste de variabilidade, não se observou reação diferencial das cultivares.
- ◆ Constatação da patogenicidade em proporção relativamente alta de *Fusarium solani*.
- ◆ Não houve efeito satisfatório das citocininas na proliferação de brotos. O regulador de crescimento BAP, apresentou maior efetividade do que a cinetina. Apesar do pequeno efeito dos reguladores de crescimento, pode-se recomendar a utilização de 0,5mg/L de BAP no meio de cultura, na ausência de ANA.
- ◆ A micropropagação comprovou ser uma técnica de reprodução vegetal viável no controle de *Fusarium*.



6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A literatura científica estrangeira dispõe de apreciáveis números de trabalhos experimentais sob condições de campo e casa de vegetação, relativos aos problemas causados por espécies de *Fusarium*. No Brasil, porém, esse assunto tem sido pouco explorado, podendo mesmo estar sendo subestimado, principalmente se forem consideradas as circunstâncias climáticas, propícias para o seu desenvolvimento, pois condições de calor e umidade favorecem intensamente o desenvolvimento da doença.

Os isolados presentes neste trabalho foram de bulbos de gladiolo infectado, material proveniente da Fundação de Apoio ao Ensino e Pesquisa (FAEPE), originário da Schoenmaker, Holambra/SP. Pode-se concluir com os resultados obtidos, que é necessário estudos relacionados inicialmente, a um período de cura em que submeteria os bulbos anterior ao armazenamento para a cicatrização das fendas e talvez manifestação e seleção dos infectados; controle na planta mãe e, as condições acondicionamento de material principalmente, a temperatura e umidade.

Afim de se caracterizar o fungo morfológicamente, todos os parâmetros morfológicos foram indicadas pelos principais taxonomistas tais como Massey (1926) específica para *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*; Booth (1971/1977) e Nelson, Toussoun e Marosas (1983), foram comparadas e estudadas nos isolados de *Fusarium* sp. de gladiolo. Todas estas características, como taxa de crescimento, coloração das colônias, dimensão, forma e formação dos conídios, comprimento das fiáides e descrição dos clamidósporos apresentaram variações com maior ou menor intensidade, estas variações, porém, não foram tão amplas ao ponto de descaracterizar as espécies de *Fusarium* encontradas no presente trabalho. Em consequência da grande variabilidade que o patógeno apresenta, se faz necessário a complementação do

estudo, utilizando técnicas moleculares, para a confirmação principalmente de *Fusarium solani*, este em que a sua constatação foi em proporção relativamente alta com relação a sua patogenicidade, fato jamais relatado na bibliografia brasileira.

Considerando os resultados obtidos, dentro das presentes condições experimentais de inoculação, verifica-se que é possível desenvolver um método no qual gládíolos jovens cultivadas *in vitro* e inoculadas com *Fusarium* sp. mostraram os sintomas típicos da doença em curto espaço de tempo. Constatou-se que o método é eficiente, pois houve correspondência na reação do cultivar inoculado *in vitro* e em casa de vegetação e, em cerca de 15 dias, foi possível obter resultados que demandariam o dobro do tempo, se executado na forma tradicional, em casa de vegetação.

Diante de tudo isso e a insuficiência de conhecimentos sobre o patógeno associado a esta cultura, esta com franco desenvolvimento e expressão sócio-econômica relevante em algumas regiões do país, sugere-se a continuação de estudo com os mesmos objetivos ou as sugestões aqui mencionadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERTON, E.W.; PARK, R. Growing gladioli. London: Timber-Press, 1989. 166p.
- ARMSTRONG, G.M.; ARMSTRONG, J.K. Reflections on the wilt fusaria. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.13, p.95-103, 1975.
- BAJAJ, Y.P.S.; SIDHU, M.M.S; GILL, A.P.S. Micropropagation of *gladiolus*. In: BAJAJ, Y.P.S; SIDHU, M.M.S; GILL, A.P.S. **High-Tech and Micropropagation IV**. Berlin: Springer-Verlag, 1992, v. 20, cap.10, p.135-143.
- BAJAJ, Y.P.S; SIDHU, M.M.S; GILL, A.P.S. Some factors affecting the *in vitro* propagation of *gladiolus*. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.18, p.269-275 1982.
- BALD, J.G. Control of disease by heat-curing and dipping gladiolus corms. II. incidence of lesions. *Phytopathology*, St. Paul, v.43, p.146-150, 1953.
- BALD, J.G; SUZUKI, T.; DOYLE, A. Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* to easter lily, narcissus and gladiolus. *Annals of Applied Biology-London, California*, v.67, p.331-342, 1971.
- BATISTA, L.A. Métodos de multiplicação de mudas matrizes de bananeira (*Musa sp.*), obtidas por cultura de meristemas. Lavras: UFLA, 1996. 51p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- BERGMAN, B.H.H; BAKKER-VAN DER VOORT, M.A.M. Latent infections in tulip bulbs by *Fusarium oxysporum*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, Wageningen, v.85, p.187-195. 1979.
- BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. **Plant tissue culture; theory and practice**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p.287-312.
- BIGRE, J.P.; MORAND, J.C.; THARAUD, M. **Patologia de los cultivos florales y ornamentales**. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 233p. Las adelomicetos, cap.4, p.123-160.

- BOEREMA, G.H.; HAMERS, M.E.C. Check-list for scientific names of common parasitic fungi. Series 3b: fungi bulbs: Amaryllidaceae and Iridaceae. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, Wageningen, v.95, p.1-32, 1989. (supplement 3).
- BOOTH, C. *Fusarium: Laboratory guide to the identification of the major species*. Kew: CMI, 1977. 58p.
- BOOTH, C. *The genus Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew: CMI, 1971. 273p.
- BURGESS, L.W.; LIDDELL, C.M.; SUMMERELL, B.A. *Laboratory manual for Fusarium research*. 2.ed., Sydney: FRL/The University of Sidney, 156p. 1988.
- CAMPOS, H. de. *Estatística experimental não-paramétrica*, 4. ed. Piracicaba: ESALQ, 1983. 349p.
- CARDOSO, E.J.B.N. *Doenças das plantas cultivadas*. In: GALLI, F. et al. *Doença das plantas ornamentais*. 2 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. v.2, cap.30.
- CHU, I.Y.E. The application of tissue culture to plant improvement and propagation in the ornamental horticulture industry. In: ZIMMERMAN, R.H.; GRIESBACH, R.J.; HAMMERSCHLAG, F.A.; LAWSON, R.H. *Tissue culture as plant production system for horticultural crops*. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1985. p.15-135.
- CRISP, P.; WALKEY, D.G.A. The use of aseptic meristem culture in cauliflower breeding. *Euphytica*, Wageningen. v.23, p.205-213, 1974.
- CROCKETT, J.U. *Bulbs*. Nederland: Time-Life Books Inc., 1977. 160p.
- DAUGHTREY, M.L.; WICK, R.L.; PETERSON, J.L. *Compendium of flowering potted plant diseases: vascular wilt diseases*. 1995. 90p. Vascular wilts caused by *Fusarium oxysporum*, p.44-45.

- DREW, R.A. Optimizing root initiation by controlling exposure to auxin. **Interaction Plant Propagator's Society. Combined Proceedings**, p.41, 1991.
- DUVAL, C.M.; CALDAS, L.S.; RESENDE, R.O. Aplicação da cultura de tecidos na fitopatologia. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. 1, 45-68
- FERNANDES, J.G. A podridão do bulbo da palma de santa rita, *gladiolus* spp., causada por *Fusarium* sp. Rio de Janeiro: **Boletim da Sociedade Brasileira de Agronomia**, v.6, n.1, p.10-16, 1943.
- FORSBERG, J.L. **Disease of ornamental plants**, London: University of Illinois Press, 1976. 220p.
- GALLI, E.H. Aspectos econômicos da floricultura no Brasil. In: **SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS**, 1, 1992. Maringá. **Anais...** Maringá: Universidade Estadual, 20p. 1992.
- GALLO, L.A; CROCOMO, O.J. A cultura de tecidos em fitopatologia. In: FILHO, A.B.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995, v.1, cap.25, p. 495-505.
- GERLACH, W. *Fusarium* species inciting plant disease in tropics. In: KRAWS, J.; SCHUMUTER, H.; KOCH, W. (eds.). **Disease, pest and weeds in tropical crops**, Pave Pany: Berlin, 592p. 1977.
- GINZBURG, C.; ZIV, M. Hormonal of cormel formation in *gladiolus* stolons grown *in vitro*. **Annals of Botany**, London, v.37, p.219-224, 1973.
- GORDON, W.L. Pathogenic strains in *Fusarium oxysporum*. **Canadian Journal of Botany**, Columbus, v.43, p. 1309-1318, 1965.
- GOULD, C.J. Influence of climate on incidence of *Fusarium* rot and dry rot in *gladiolus* corms. **Phytopathology**, St. Paul, v.39, p.8, 1949.

- GRAJAL-MARTIN, M.P.; SIMON, C.Y.; MUEHLBAUER, F.Y. Use of Randon Amplified Polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi. *Phytopathology*, St. Paul, v.33, n.6, p.612-614, 1993.
- GRATTAPAGLIA, P; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPQ. 1990. p.99-169.
- GRIGOLETTI, A.J. Fusariose da videira: caracterização, variabilidade do *Fusarium oxysporum* f.sp. *herbentis* e fontes de resistência em *vitis* spp. Viçosa: UFV, 1985. 76p (Dissertação - Doutorado em Fitopatologia).
- HENIS, Y.; ZILBERSTEIN, Y. Detection of latent *Fusarium* in gladiolus corms. *The Journal of Horticultural Science*, Ashford, v.48, p.189-194, 1973.
- HOL, G.M.G.M; van der LINDE, P.C.G. Reduction of contamination in bulb-explant cultures of *Narcissus* by a hot-water treatment of parent bulbs. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v.33, p.105-119, 1992.
- HOLGATE, D.P. Propagation of ornamentals by tissue culture. In: REINERT, I.; BAJAJ, Y.P.S. *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture*. New York: Springer-Verlag, 1977, p.18-42.
- HUSSEY, G. *In vitro* propagation of gladiolus by precocious axillary shoot formation. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.6, p.287-296, 1977.
- JOLY, A.B. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 11. ed. São Paulo: Ed. Nacional, 1993. 777p.
- JONES, B.; SLUIS, C.J. Marketing of micropropagated plants. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. *Micropropagation: technology and application*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.141-154.

- JONES, R.K.; JÚNIOR, M.J. Evaluation of resistência in *Gladiolus* sp. to *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*. *Phytopathology*, St Paul, v.65, p.481-484, 19745
- JOYCE, D. *Bulbosas florida, guia jardim blume*. Barcelona: Blume, 1994. 48p.
- KAUR, S., ARORA, J.S; KHANNA, K. *Fusarium-wilt* is a limiting factor in commercial cultivation of gladiolus. *Indian Horticulture*, Pusa, v.36, p.21-22, 1989.
- KIM, D.H; MARTYN, R.D; MAGILL, C.W. Restriction fragment lenght polymosphism groups and physical map of mitochondrial DNA from *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*. *Phytopathology*, St. Paul, v.82, p.346-353, 1992.
- KISTLER, H.C.et al. Relatedness of strains of *Fusarium oxysporum* from crucifers measured by examination of mitochondrial and ribosomal DNA. *Phytopathology*, St. Paul, v.77, p.1289-1293, 1987.
- KRIKORIAN, A.D.; CRONAUER, S.S. Banana. In: SHARP, W.R. et al., ed. *Handbook of plant cell culture*. New York: MacMillan, 1984. p.327-348.
- KUCHAREK, T; SIMONE, G; MULLIN, R.S. Disease the galdiolus and lilium. *Florida Plant Disease Control Guide*, Gainesville, 1978. p.23-28.
- LANGERAK, C.J.; HAANSTRA-VERBEEK, J. The influence of physiological and abiotic factors on the pathogenesis of *Fusarium oxysporum* Schl. f.sp. *narcissi*. *Acta Botanica Neerlandica*, Oxford, v.26, p.267, 1977.
- LESHEN, B.; WERKER, E.; SHALEV, D.P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. *Annals of Botany*, London, v.62, p.271-276, 1988.

- LÖFFLER, H.J.M.; FLORACK, D.E.A. Engineerin for bacterial and fungal disease resitance. In: GENEVE, R.Z.; PRECE, J.E., MERKEE, S.A. **Bioteçnhonology of ornamental plants**. Wallingford: CAB International, 1997. p.313-333.
- LÖFFLER, H.J; STRATHOF, RIJIBROK; ROEBRQECK. *Fusarium* resistance in gladiolus: the development of a screening assay. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.145, p. 465-468, 1997.
- LORENZI, H; SOUZA, H.M. **Plantas ormentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. Nova Odessa (SP): Plantarum, 1995. 720p.
- LUZ, J.M.Q. **Obtenção *in vitro* de plantas de mandioquinha salsa (*Aracacia xanthorrhiza* Brancroft) via cultura de meristemas**. Lavras: ESAL, 1993. 52p (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- MAGIE, R.O. **Gladiolus *Fusarium* disease development and control**. **Gladiolus**, Serrey, v.41, p.106-110, 1966.
- MAGIE, R.O., **Carbon dioxide treatment of gladiolus corms reveals latent *Fusarium* infections**. **The Plant Disease Reporter**, St.Paul, v.55, p.340-341, 1971.
- MARSHALL, B.H.J. **Relation of wound periderm in gladiolus corms to penetration by *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli***. **Phytopathology**, St Paul, v.43, p.425-431, 1953.
- MASSEY, L.M. ***Fusarium* rot of gladiolus corms**. **Phytopathology**, St Paul, v.16. p.509-523, 1926.
- McCLELLAN, W.D. **Pathogenicity of the vascular fusarium of gladiolus to some additional iridaceous plants**. **Phytopathology**, St Paul, v.35, p.921-931, 1945.
- McCLELLAN, W.D.; PRYOR, R.L. **Susceptibility of gladiolus varieties to *Fusarium*, *Botrytis* and *Curvularia***. **The Plant Disease Reporter**, St Paul, v.41, p.47-50, 1957.

- MES, J.J.; DOOR, J. VAN; ROEBROECK, J.A.; EGMOND, VAN. Restriction fragment length polymorphisms, races and vegetative compatibility groups within a worldwide collection of *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*. *Plant Pathology*, Oxford, v.43, p.362-370, 1994.
- MESSIAEN, C.M.; CASSINI, R. Taxonomy of *Fusarium*. In: NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; COOK, R.J. (eds.). *Fusarium* diseases, biology and taxonomy. University Park, Pennsylvania State University. 1968. p.427-445.
- MIRZA, J.H.; SHAKIR, A.S. First reporter of fungal pathogens of gladiolus from Pakistan. *Journal of Phytopathology Pakistan*. v. 3, p.74-76, 1991.
- MORGAN-JONES, G. Diaporthe phaseolorum complex of soybean. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.17, n 4, p.359-367, 1992.
- MUCULLOCH, L. A vascular disease of gladiolus caused by *Fusarium*. *Phytopathology*, St Paul, v.34, p.263-286, 1943.
- MUCULLOCH, L. A vascular disease of gladiolus caused by *Fusarium*. *Phytopathology*, St Paul, v.34, p.263-287, 1944.
- MURASHIGE, T. Plant growth substances in commercial uses of tissue culture. In: SKOOG, F. *Plant growth substances*, Berlin: Springer-Verlag, 1974. p.426-434.
- MURASHIGE, T; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and biossays with tabbacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NAKAGAVA, J. Teste de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: VIEIRA, R.D; CARVALHO, N.M. (eds.). *Teste de vigor em semente*. Jaboticabal: FUNEPE, 1994. p.49-85.
- NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; MARASAS, W.F.O. *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. University Park, Pennsylvania State University Press, 1983. 193p.

- NIRENBERG, H.I. A simplified method for identifying *Fusarium* sp. occurring on wheat. *Canadian Journal of Botany*, Madison, v.59, p.1599-1609, 1981.
- OLIVETTI, M.P.A.; TAKES, M.; MATSUNAGA, M.; E. Perfil da produção das principais flores de corte no estado de São Paulo. *Informações Econômicas*, São Paulo, v.24, n.7, p.31-54, 1994.
- PALMER, J.G., PRYOR, R.L. Evolution of 160 varieties of gladiolus for resistance to *Fusarium* yellows. *The Plant Disease Reporter.*, St Paul, v.42, p.1405-1407, 1958.
- PALMER, J.G., PRYOR, R.L.; STEWARD, R.N. Resistance of gladiolus to *Fusarium* yellows. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, Orlando, v.86, p.656-661, 1958.
- PAPE, H. Enfermedades, enemigos animales y daños de las distintas especies y géneros de plantas ornamentales enumeradas por orden alfabético. In: PAPE, H. Nueva enciclopedia de agricultura, plagas de las flores y de las plantas ornamentales. Oikos-tan, s.a. Barcelona: Vilassar de Mar, 1977. Gladiolus, p.656.
- PARTRIDGE, J.E. Specific gene product of *Fusarium*: analysis of ribosomal proteins. *Phytopathology*, St. Paul, v.81, p.1055-1058, 1991.
- PASQUAL, M.; HOFFMAN, A.; RAMOS, J.D. Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações-meios de cultura. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 126p.
- PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações-introdução: fundamentos básicos. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 159p.
- PESCADOR, R; KOLLER, O.C. Propagação *in vitro* do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill) cv. Pérola. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Cruz das Almas, v.14, n. 2, p.1-4, 1992.

- PINEY, R.D.; HILDEBRANDT, A.C. Important *Gladiolus* diseases in Wisconsin. *Phytopathology*, St Paul, v.58, p.103, 1968.
- PIRONE, P.P.; DODGE, B.O.; RICKETT, H.W. Disease and pest of ornamental plants. 4 ed, New York-Botanica Garden: Ronald Press, 1970. 516p.
- PITTA, G.P.B, R.M.G; CARDOSO; CARDOSO, E.J.B.N. Doença de plantas ornamentais. São Paulo: Instituto Brasileiro do Livro Científico, 1989. 174p.
- PITTA, G.R.B. Flores e plantas ornamentais para exportação: aspectos fitossanitários. Brasília: EMBRAPA, 1995. 50p. (Série Publicações Técnicas FRUPEX, 17.
- PRYOR, R.L. Relative survival of seven gladiolus cultivars after field exposure to *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Washington, v.96, n.3, p.367-369, 1971.
- QI-GUANG, Y.; READ, P.E; FELLMAN, C.D.; HOSIER, M.A. Effect of cytokinins, IBA and rooting regime na chineses ches trat *in vitro*. *HortScience*, Bradenton, 21, p.133-134, 1986.
- QUAK, F. Meristem culture and virus-free. In: REINERT, J., BAJAJ, Y.P.S. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ. Berlin: Springer-Verlang. 1977. p.589-615.
- REES, A.P. Ornamental bulbs, corms and tubers. Wallingford: CAB International, 1992. 220p.
- REES, A.R The growth of bulbs; applied aspects of the physiology of ornamental bulbous crops plants. London: Academic Press. 1972. Bulb disease, p.257.
- REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture, Berlin: Springer-Verlag, 1977. 803p.

- REMOTTI, P.C., LÖFFLER, H.J.M.; VLOTEN-DOTING, L.van Selection of cell-lines and regeneration of plants resistant to fusaric acid from gladiolus x grandiflorus cv. "Peter Pears". *Euphytica*, Wageningen, v.96, p.237-245, 1997.
- REMOTTI, P.C.; LÖFFLER, H.J.M. The involvement of fusaric acid in the bulb-rot of gladiolus. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v.144, p.405-411, 1996.
- ROEBROECK, E.J.A.; MES, J.J. Physiological races and vegetative compatibility groups within *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, Wageningen, v.98, p.57-54, 1992.
- ROEBROECK, E.J.A.; GROEN, N.P.A.; MES, J.J. Detection of latent *Fusarium oxysporum* in gladiolus corms. *Acta Horticulturae*, Leuven, v.266, p.469-476, 1990.
- SALINGER, J.P. *Producción comercial de flores*. Zaragoza: Acribia, 1991. 371p. Gladiolus, cap. 12, p.119-140.
- SAS INSTITUTE. *SAS Procedures guide for computers*. v.3, 6 ed. Cary NC: SAS Institute Inc. 1993, 373p.
- SOUZA, E.L.S. Conservação de germoplasma *in vitro*. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1988. Jaboticabal. Anais... Jaboticabal: FCAV/UNESP/CENARGEM/EMBRAPA, 1988. p. 102-105.
- SYNDER, W.C.; HANSEN, H.N The species concept in *Fusarium*. *American Journal Botany*, Columbus, v.27, p.64-67, 1940.
- TOMBOLATO, A.F.C. Ornamentais e flores. In: RAIJ, B. van. et al. *Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo*, 2. ed. Campinas: Instituto Agronômico e Fundação, 1996. p.207-219.
- TOUSSOUN, T.A.; NELSON, P.E. *A pictorial guide to the identification of Fusarium sp., according to the taxonomic sistem of Snyder and Hansen*. 2. ed. The Pennsylvania State University Press, 1976. 43p.

- TUITE, J. Media and nutrient solutions used by plant pathologists and mycologist. In: STOVER, R.H.; WAITE, B.H. *Plant Pathological Methods: fungi and bacteria*. Minneapolis: Burgess, 1969. P.1-80.
- VENTURA, J.A. *Fusariose do abacaxizeiro: caracterização do patógeno, epidemiologia da doença, resistência e micropropagação do hospedeiro in vitro*. Viçosa: UFV, 1994. 111p. (Dissertação - Doutorado em Fitopatologia).
- VENTURA, J.A.; ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G. M. Integrated management system for pineapple *Fusarium* disease control. *Acta Horticulturae*, Leuven, v.334, p.439-453, 1993.
- VERHOEFF, K. Latent infections by fungi. *Annual Review of Phytopathology*, St Paul, v.12, p.99-110, 1974.
- VILJOEN, A.; WINGFIELD, M.J. Characterization of *Fusarium* isolates from gladiolus corms pathogenic to pines. *The Plant Disease Reports*, St. Paul, v.79, p.1240-1244, 1995.
- WAITE, B.H., STOVER, R.H. Studies on *Fusarium* wilt of bananas, variability and the cultivar concept in *Fusarium oxysporum cubense*. *Canadian Journal of Botany*, Madison, v.38, p.985-995, 1960.
- WALKER, K.A.; Yu, P.C.; SATO, S.J.; JAWORSKI, E.G. The hormonal control of organ formation in callus of *Medicago sativa* L. *in vitro*. *American Journal of Botany*, Columbus, v.65, p.654-659, 1978.
- WILFRET, G.J. "Dr. Magie" gladiolus. *HortScience*, Bradenton, v.21, n.1, p.163-164, 1986.
- WILFRET, G.J. "Florida Flame" gladiolus. *HortScience*, Bradenton, v.16, n.6, p.787-788, 1981.
- WILFRET, G.J. "Morning Mist" gladiolus. *HortScience*, Bradenton, v.28, n.7, p.752-753, 1993.

- WILFRET, G.J. *Gladiolus*. In: LARSON, R.A. *Introduction to floriculture 2*. ed. San Diego: Academic Press, 1992, cap. 6, p.143-157.
- WILFRET, G.J. Shoot tip culture of *gladiolus*: an evaluation of nutrient media for callus tissue development. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, Orlando, v.84, p.389-393, 1971.
- WILFRET, G.J.; MAGIE, R.O. "Jessie M. Conner" *gladiolus*. *HortScience*, Bradenton, v.14, n.5, p.642-644, 1979.
- WINDELS, C.E. Current status of *Fusarium* taxonomy. *Phytopathology*, St Paul, v.81, p.1048-1051, 1991.
- WOLTZ, S.S. *Gladiolus Fusarium* disease: assay soilborne inoculum potencial of cultivar susceptibility. *The Plant Disease Reporter*, St Paul, v.58, p.184-187, 1974.
- WOLTZ, S.S. MAGIE, R.O.; NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A. *Gladiolus* disease responses to prestorage corm inoculation with *Fusarium* species. *The Plant Disease Reporter*, St Paul, v. 62, p.134-137, 1978.
- WOLTZ, S.S; MAGIE, R.O. *Gladiolus Fusarium* corm rot: a method of cross-indexing pathogen isolates and host cultures for virulence susceptibility reaction. *The Plant Disease Reporter*, St Paul, v.57, p.957-960, 1973.
- ZIV, M.; HALEVY, A.H.; SHILO, R. Organs and plantlets regeneration of *Gladiolus* through tissue culture. *Annals of Botany*, London, v.34, p.671-676, 1970.

ANEXOS

ANEXO A	Página
QUADRO 1	Análise de fertilidade do solo para experimentos realizados em Lavras, MG. UFLA, Lavras, MG, 1998..... 83
QUADRO 2	Preparação de solução estoques do meio Murashige & Skoog (1962)..... 84
QUADRO 3	Dados climatológicos dos meses de plantio até a época de aparecimento dos sintomas da doença em plantas de gladiolos. UFLA, Lavras, MG, 1998..... 85
TABELA 1	Índice de crescimento micelial de colônias de <i>Fusarium</i> sp. aos sete dias de desenvolvimento, a 23°C. Média de seis repetições. UFLA, Lavras, MG, 1998..... 85
TABELA 2	Médias estimadas do índice visual para testar a hipótese de igualdade entre tratamentos dos experimentos em função das características (folhas novas e velhas, bulbo novo, altura das plantas e diâmetro do bulbo novo). UFLA, Lavras, MG, 1998..... 86
TABELA 3	Quadrados médios obtidos para desenvolvimento de gemas apicais de gladiolo, var. White Friendship, em função dos reguladores de crescimento BAP e ANA. UFLA, Lavras, MG, 1998..... 86
TABELA 4	Quadrados médios obtidos para desenvolvimento de gemas apicais de gladiolo, var. White Friendship, em função dos reguladores de crescimento cinetina e ANA. UFLA, Lavras, MG, 1998..... 87
TABELA 5	Resumo da análise de variância da interação do regulador BAP dentro de ANA na formação de brotos da cultivar White Friendship cultivado <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras, MG, 1998..... 87

TABELA 6	Resumo da análise de variância da interação do regulador cinetina dentro de ANA na formação de brotos da cultivar White Friendship cultivado <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras, MG, 1998.....	88
TABELA 7	Resumo da análise de variância da interação do regulador BAP dentro de ANA no tamanho de brotos da cultivar White Friendship cultivado <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras, MG, 1998.....	88
TABELA 8	Resumo da análise de variância da interação do regulador cinetina dentro de ANA no tamanho de brotos da cultivar White Friendship cultivado <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras, MG, 1998.....	89
TABELA 9	Resumo da análise de variância da interação do regulador BAP dentro de ANA na formação de raízes da cultivar White Friendship cultivado <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras, MG, 1998.....	89
TABELA 10	Resumo da análise de variância da interação do regulador cinetina dentro de ANA na formação de raízes da cultivar White Friendship cultivado <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras, MG, 1998.....	90
TABELA 11	Resumo da análise de variância da interação do regulador BAP dentro de ANA no comprimento de raízes da cultivar White Friendship cultivado <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras, MG, 1998.....	90
TABELA 12	Resumo da análise de variância da interação do regulador cinetina dentro de ANA no comprimento de raízes da cultivar White Friendship cultivado <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras, MG, 1998.....	91
TABELA 13	Resumo da análise de variância da interação do regulador ANA dentro de BAP na formação de brotos da cultivar White Friendship cultivado <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras, MG, 1998.....	91

TABELA 14	Resumo da análise de variância da interação do regulador ANA dentro de cinetina na formação de brotos da cultivar White Friendship cultivado <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras, MG, 1998.....	92
TABELA 15	Resumo da análise de variância da interação do regulador ANA dentro de BAP no tamanho de brotos da cultivar White Friendship cultivado <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras, MG, 1998.....	92
TABELA 16	Resumo da análise de variância da interação do regulador ANA dentro de cinetina no tamanho de brotos da cultivar White Friendship cultivado <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras, MG, 1998.....	93
TABELA 17	Resumo da análise de variância da interação do regulador BAP dentro de ANA na formação de raízes da cultivar White Friendship cultivado <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras, MG, 1998.....	93
TABELA 18	Resumo da análise de variância da interação do regulador ANA dentro de cinetina na formação de raízes da cultivar White Friendship cultivado <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras, MG, 1998.....	94
TABELA 19	Resumo da análise de variância da interação do regulador ANA dentro de BAP no comprimento de raízes da cultivar White Friendship cultivado <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras, MG, 1998.....	94
TABELA 20	Resumo da análise de variância da interação do regulador ANA dentro de cinetina no comprimento de raízes da cultivar White Friendship cultivado <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras, MG, 1998.....	95

QUADRO 1A. Análise de fertilidade do solo para experimentos realizados em Lavras, MG. UELA, Lavras, MG, 1998.

Amostra	t
Cultura	Gladiolo
PH em água	6,1 AcF
P (ppm)	33 A
K (ppm)	530 A
Ca (meq/100cc)	7,9 A
Mg (meq/100cc)	2,5 A
Al (meq/100cc)	0,0 B
H + Al (meq/100cc)	2,3 B
S (meq/100cc)	11,8 A
t (meq/100cc)	11,8 A
T (meq/100cc)	14,1 A
m. (%)	0 B
V. (%)	84 A
Carbono (%)	3,0 A
Matéria orgânica (%)	5,1 A
Areia (%)	3,6 A
Zinco (ppm)	4,2
Cobre (ppm)	1,9
Ferro (ppm)	44,0
Manganês (ppm)	22,0
Enxofre (ppm)	208,0
Boro (ppm)	0,56

S = soma de bases trocáveis	AcM = acidez média
M = saturação de Al da CTC efetiva	AIE = alcalinidade elevada
AcE = acidez elevada	M = médio
AIF = alcalinidade fraca	A = alto
MB = muito baixo	t = CTC efetiva
B = baixo	AcF = acidez fraca
V = saturação de bases da CTC a pH 7	N = neutro
T = CTC a pH 7	MA = muito alto

QUADRO 2A. Preparação de solução estoques do meio Murashige & Skoog (1962).

Solução estoque	Componentes	Concentração (g.l ⁻¹)
	Macronutrientes	
A	NH ₄ NO ₃	165
B	KNO ₃	190
C	CaCl ₂ .2 H ₂ O	44
D	MgSO ₄ .7 H ₂ O	37
E	KH ₂ PO ₄	17
Micronutrientes		
F	MnSO ₄ .H ₂ O	1,690
	H ₃ BO ₃	0,620
	ZnSO ₄ .7 H ₂ O	0,860
	KI	0,083
	Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0,025
	CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,0025
	CoCl ₂ .6 H ₂ O	0,0025
FeEDTA		
G	Na ₂ EDTA.2 H ₂ O	3,73
	FeSO ₄ .7 H ₂ O	2,78
Mistura orgânica		
H	Tiamina HCL	0,02
	Ácido nicotínico	0,1
	Pirodoxina.HCL	0,1
	Glicina	0,4

QUADRO 3A. Dados climatológicos dos meses de plantio até a época de aparecimento dos sintomas da doença em plantas de gladiolos. Casa de Vegetação, UFLA, Lavras, MG, 1998.

Semanas	Temperatura média		Umidade relativa	
	Máxima	Mínima	Máxima	Mínima
1 ^o	22,0	13,3	99,3	79,8
2 ^o	25,6	15,3	99,7	76,8
3 ^o	26,1	14,7	87,2	85,7
4 ^o	31,4	15,1	98,0	67,8
5 ^o	29,6	15,1	99,6	67,0
6 ^o	31,8	6,4	98,1	57,0
7 ^o	29,3	16,0	100,0	61,7
8 ^o	35,1	14,0	98,3	64,8
9 ^o	36,4	16,0	96,5	64,0
10 ^o	37,2	15,0	89,3	63,8

TABELA 1A. Índice de crescimento micelial de colônias de *Fusarium* sp. aos sete dias de desenvolvimento a 23°C. Média de seis repetições. UFLA, Lavras, MG, 1998.

F.V.	G.L	QM	Prob.>F
Tratamento	8	2,1616	274,56
Resíduo	45	0,0079	
Total	53		

Média geral = 3,78

CV = 2,35

TABELA 2A. Médias estimadas do índice visual para testar a hipótese de igualdade entre tratamentos dos experimentos em função das características (folhas novas e velhas, bulbo novo, altura das plantas e diâmetro do bulbo novo). UFLA, Lavras, MG, 1998.

Experimentos	¹ Folha nova	¹ Folha velha	¹ Bulbo novo	² Altura planta	² Diâmetro bulbo novo
Variabilidade	47,858	63,267	54,971	80,506 ^{BS}	4,681
Patogenicidade da cultivar White Friendship	24,805	24,516	26,496	71,320.	3,696
Patogenicidade da cultivar Traderhorn	19,679	24,854	24,395	81,996	4,190

1 Valores de Qui-Quadrado calculados conforme o critério de Kruskal-Wallis

2 Teste de Tukey a 5% de probabilidade

TABELA 3A. Quadrados médios obtidos para desenvolvimento de gemas apicais de gladiolo, var. White Friendship em função dos reguladores de crescimento BAP e ANA. UFLA, Lavras, MG, 1998.

Fonte de variação	Quadrados médios				
	GL	N ^o * brotos	Tam.* brotos	N ^o * raízes	Tam.* Raízes
BAP	4	0,915	80,693	6,097	2,046
ANA	2	6,656	422,467	4,917	1,310
BAP x ANA	8	4,508	130,619	2,588	1,574
Resíduo	60	0,106	8,071	9,427	0,582
CV (%)		15,285	36,029	40,322	89,266

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

TABELA 4A. Quadrados médios obtidos para desenvolvimento de gemas apicais de gladiolo, var. White Friendship, em função dos reguladores de crescimento cinetina e ANA. UFLA, Lavras, MG, 1998.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios			
		N ^o . brotos	Tam. brotos	N ^o . raízes	Tam. raízes
Cinetina	4	6,207	250,518	6,511	2,027
ANA	2	3,012	65,302	1,084	1,065
Cinetina x ANA	8	2,837	30,168	3,713	0,780
Resíduo	60	0,242	5,699	0,601	0,228
CV (%)		20,163	28,429	36,700	51,498

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

TABELA 5A. Análise de variância da interação do regulador BAP dentro de ANA na formação de brotos da cultivar White Friendship cultivado *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 1998.

F.V.	G.L.	Q.M.	Valor Fc	Prob.> F
BAP dentro de ANA 1	4	2,093124	19,6327	0,00000
BAP dentro de ANA 2	4	4,831286	45,3157	0,00000
BAP dentro de ANA 3	4	3,007416	28,2085	0,00000
Resíduo	60	0,126614		
Total	74			

Média geral = 2,13

CV = 15,28

TABELA 6A. Análise de variância da interação do regulador cinetina dentro de ANA na formação de brotos da cultivar White Friendship cultivado *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 1998.

F.V.	G.L	Q.M.	Valor Fc	Prob.> F
Cin. dentro de ANA 1	4	0,459740	1,8975	0,12200
Cin. dentro de ANA 2	4	4,745986	19,5886	0,00000
Cin. dentro de ANA 3	4	6,677726	27,5617	0,00000
Resíduo	60	0,244483		
Total	74			

Média geral = 2,44

CV = 20,16

TABELA 7A. Análise de variância da interação do regulador BAP dentro de ANA no tamanho de brotos da cultivar White Friendship cultivado *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 1998.

F.V.	G.L	Q.M.	Valor Fc	Prob.> F
BAP dentro de ANA 1	4	124,994600	15,4860	0,00000
BAP dentro de ANA 2	4	165,071400	20,4512	0,00000
BAP dentro de ANA 3	4	51,866600	6,4259	0,00022
Resíduo	60	8,071467		
Total	74			

Média geral = 7,88

CV = 36,02

TABELA 8A. Análise de variância da interação do regulador cinetina dentro de ANA no tamanho de brotos da cultivar White Friendship cultivado *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 1998.

F.V.	G.L	Q.M.	Valor Fc	Prob.> F
Cin. Dentro de ANA 1	4	84,476600	14,8225	0,00000
Cin. Dentro de ANA 2	4	123,698400	21,7045	0,00000
Cin. Dentro de ANA 3	4	102,680600	18,0167	0,00000
Resíduo	60	5,699200		
Total	74			

Média geral = 8,39

CV = 28,42

TABELA 9A. Análise de variância da interação do regulador BAP dentro de ANA na formação de raízes da cultivar White Friendship cultivado *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 1998.

F.V.	G.L	Q.M.	Valor Fc	Prob.> F
BAP dentro de ANA 1	4	6,946804	16,2619	0,00000
BAP dentro de ANA 2	4	1,980580	4,6364	0,00247
BAP dentro de ANA 3	4	2,346466	5,4929	0,00077
Resíduo	60	0,427182		
Total	74			

Média geral = 1,62

CV = 40,32

TABELA 10A. Análise de variância da interação do regulador cinetina dentro de ANA na formação de raízes da cultivar White Friendship cultivado *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 1998.

F.V.	G.L	Q.M.	Valor Fc	Prob.> F
Cin. Dentro de ANA 1	4	2,252624	3,7458	0,00863
Cin. Dentro de ANA 2	4	5,930176	9,8609	0,00000
Cin. Dentro de ANA 3	4	5,755544	9,5706	0,00000
Residuo	60	0,601381		
Total	74			

Média geral = 2,11
CV = 36,70

TABELA 11A. Análise de variância da interação do regulador BAP dentro de ANA no comprimento de raízes da cultivar White Friendship cultivado *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 1998.

F.V.	G.L	Q.M.	Valor Fc	Prob.> F
BAP dentro de ANA 1	4	2,721000	4,6747	0,00234
BAP dentro de ANA 2	4	1,207600	2,0747	0,09481
BAP dentro de ANA 3	4	1,266600	2,1760	0,08202
Residuo	60	0,582067		
Total	74			

Média geral = 0,85
CV = 89,26

TABELA 12A. Análise de variância da interação do regulador cinetina dentro de ANA no comprimento de raízes da cultivar White Friendship cultivado *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 1998.

F.V.	G.L	Q.M.	Valor Fc	Prob.> F
Cin. Dentro de ANA 1	4	0,309600	1,3575	0,25867
Cin. Dentro de ANA 2	4	2,105000	9,2298	0,00001
Cin. Dentro de ANA 3	4	1,173400	5,1450	0,00123
Resíduo	60	0,228067		
Total	74			

Média geral = 0,92

CV = 51,49

TABELA 13A. Análise de variância da interação do regulador ANA dentro de BAP na formação de brotos da cultivar White Friendship cultivado *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 1998.

F.V.	G.L	Q.M.	Valor Fc	Prob.> F
ANA dentro de BAP 1	2	9,761387	91,5582	0,00000
ANA dentro de BAP 2	2	10,450640	98,0231	0,00000
ANA dentro de BAP 3	2	4,069520	38,1706	0,00000
ANA dentro de BAP 4	2	0,052687	0,4942	0,60990
ANA dentro de BAP 5	2	0,355487	0,3343	0,04123
Resíduo	60	0,106614		
Total	74			

Média geral = 2,13

CV = 15,28

TABELA 14A. Análise de variância da interação do regulador ANA dentro de cinetina na formação de brotos da cultivar White Friendship cultivado *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 1998.

F.V.	G.L	Q.M.	Valor Fc	Prob.> F
ANA dentro de cin. 1	2	1,146560	4,7323	0,01195
ANA dentro de cin. 2	2	1,298047	5,3576	0,00698
ANA dentro de cin. 3	2	1,244240	5,1355	0,00844
ANA dentro de cin. 4	2	7,123860	29,4031	0,00000
ANA dentro de cin. 5	2	3,551227	14,6574	0,000001
Resíduo	60	0,242283		
Total	74			

Média geral = 2,44
CV = 20,16

TABELA 15A. Análise de variância da interação do regulador ANA dentro de BAP no tamanho de brotos da cultivar White Friendship cultivado *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 1998.

F.V.	G.L	Q.M.	Valor Fc	Prob.> F
ANA dentro de BAP 1	2	449,800667	55,7273	0,00000
ANA dentro de BAP 2	2	369,488667	45,7771	0,00000
ANA dentro de BAP 3	2	104,216000	12,9117	0,00002
ANA dentro de BAP 4	2	19,092667	2,3655	0,10042
ANA dentro de BAP 5	2	2,348667	0,2910	0,74768
Resíduo	60	8,071467		
Total	74			

Média geral = 7,88
CV = 36,02

TABELA 16A. Análise de variância da interação do regulador ANA dentro de cinetina no tamanho de brotos da cultivar White Friendship cultivado *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 1998.

F.V.	G.L	Q.M.	Valor Fc	Prob.> F
ANA dentro de cin. 1	2	49,378667	8,6641	0,00047
ANA dentro de cin. 2	2	4,578000	0,8033	0,44884
ANA dentro de cin. 3	2	7,544667	1,3238	0,27003
ANA dentro de cin. 4	2	72,772667	12,7689	0,00002
ANA dentro de cin. 5	2	51,702000	9,0718	0,00034
Resíduo	60	5,699200		
Total	74			

Média geral = 8,39

CV = 28,42

TABELA 17A. Análise de variância da interação do regulador ANA dentro de BAP na formação de raízes da cultivar White Friendship cultivado *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 1998.

F.V.	G.L	Q.M.	Valor Fc	Prob.> F
ANA dentro de BAP 1	2	12,381887	28,9850	0,00000
ANA dentro de BAP 2	2	0,945500	2,2133	0,11578
ANA dentro de BAP 3	2	0,459980	1,0768	0,34324
ANA dentro de BAP 4	2	0,938687	2,1974	0,11752
ANA dentro de BAP 5	2	0,543847	1,2731	0,28361
Resíduo	60	0,427182		
Total	74			

Média geral = 1,62

CV = 40,32

TABELA 18A. Análise de variância da interação do regulador ANA dentro de cinetina na formação de raízes da cultivar White Friendship cultivado *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 1998.

F.V.	G.L.	Q.M.	Valor Fc	Prob.> F
ANA dentro de cin. 1	2	2,048107	3,4057	0,03865
ANA dentro de cin. 2	2	2,285527	3,8005	0,02712
ANA dentro de cin. 3	2	3,550447	5,9038	0,00440
ANA dentro de cin. 4	2	7,908500	13,1506	0,00002
ANA dentro de cin. 5	2	0,144620	0,2405	0,78669
Resíduo	60	0,601381		
Total	74			

Média geral = 2,11

CV = 36,70

TABELA 19A. Análise de variância da interação do regulador ANA dentro de BAP no comprimento de raízes da cultivar White Friendship cultivado *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 1998.

F.V.	G.L.	Q.M.	Valor Fc	Prob.> F
ANA dentro de BAP 1	2	2,634667	4,5264	0,01429
ANA dentro de BAP 2	2	0,608000	1,0446	0,35421
ANA dentro de BAP 3	2	0,050667	0,0870	0,91824
ANA dentro de BAP 4	2	2,392667	4,1106	0,02059
ANA dentro de BAP 5	2	1,922667	3,3032	0,04241
Resíduo	60	0,582067		
Total	74			

Média geral = 0,85

CV = 89,26

TABELA 20A. Análise de variância da interação do regulador ANA dentro de cinetina no comprimento de raízes da cultivar White Friendship cultivado *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 1998.

F.V.	G.L.	Q.M	Valor Fc.	Prob.>F
ANA dentro de cin. 1	2	0,050667	0,2222	0,80136
ANA dentro de cin. 2	2	0,266000	1,1663	0,31457
ANA dentro de cin. 3	2	0,842667	3,6948	0,02981
ANA dentro de cin. 4	2	2,395500	10,5035	0,00012
ANA dentro de cin. 5	2	0,632000	2,7711	0,06894
Residuo	60	0,228067		
Total	74			

Média geral = 0,92

CV = 51,49

Erro = 0,228067
n = 60