

**INOCULAÇÃO DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* EM
SEMENTES DE FEIJOEIRO POR MEIO DA
RESTRICÇÃO HÍDRICA**

MARIA LUIZA NUNES COSTA

2000

51103

MVN. 35987

MARIA LUIZA NUNES COSTA

**INOCULAÇÃO DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* EM SEMENTES
DE FEIJOEIRO POR MEIO DA RESTRIÇÃO HÍDRICA**

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

Orientador

Prof. José da Cruz Machado



LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

2000

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

Costa, Maria Luiza Nunes

Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro por meio da restrição hídrica / Maria Luiza Nunes Costa. -- Lavras : UFLA, 2001.
70 p. : il.

Orientador: José da Cruz Machado.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Potencial hídrico. 2. Semente. 3. Feijão. 4. Sacarose. 5. Cloreto de potássio.
6. Manitol. 7. Inoculação. 8. *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.65294

-635.65221

MARIA LUIZA NUNES COSTA

**INOCULAÇÃO DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* EM SEMENTES
DE FEIJOEIRO POR MEIO DA RESTRIÇÃO HÍDRICA**

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

APROVADA em 04 de dezembro de 2000

Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães

UFLA

Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza

UFLA



Prof. José da Cruz Machado

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

A Ana Clara
pela força e coragem que,
com sua inocência, despertou em mim.

Ao Paulinho
pelo apoio e incentivo
nesta caminhada.

Eu dedico.

‘...A semente lançada à cova escura chorou, atormentada, e indagou por que motivo era confinada assim, ao extremo abandono; entretanto, em se vendo transformada em arbusto, avançou para o Sol e fez-se árvore respeitada e generosa, abençoando a terra que a isolara no seu seio....’

Emmanuel

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. José da Cruz Machado, pela oportunidade, orientação e ensinamentos transmitidos durante o curso.

À Universidade Federal de Lavras, através do Departamento de Fitopatologia, pela aceitação e colaboração na execução das pesquisas.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de pesquisa.

Ao Professor Dr. Renato Mendes Guimarães pela receptividade, sugestões e orientações dadas no decorrer da pesquisa.

Ao Professor Dr. Edson Ampélio Pozza pelas sugestões oportunas, pelas orientações e boa vontade sempre demonstrada.

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia, Ricardo, Antônia, Hilário, Vicente, Mário Lúcio e Ludwig, pelos ensinamentos e contribuições dadas durante o curso.

À Professora Dra. Maria das Graças, pelos ensinamentos, ao Biólogo Dr. João Almir de Oliveira, Ana, Maria, Renatinha, pelo auxílio nos trabalhos realizados no Setor de Sementes/Departamento de Fitotecnia.

Aos meus amigos e companheiros de caminhada, Flávio Henrique, Wirton, Kátia, Alessandra Nakasone, Leimi, Viviane, Alessandra Ferreira, Mauro Kimura, Jane, Leonardo, Andréia, Ênia Mara, Vanda, Hudson, Dênis, Ana, Eloisa, Cléber, Ângela, Terezinha, Carzinho, D. Zélia, Nair, pelo apoio, amizade, ensinamentos, carinho, alegrias e dificuldades que compartilhamos nestes últimos anos.

Ao estatístico Carlos Ledo pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos meus familiares, que me ensinaram valores importantes nesta vida, como amor, educação, honestidade, respeito e boa vontade para com o próximo.

A Deus pelo amparo durante a caminhada da vida.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Murcha ou Amarelecimento de <i>Fusarium</i>	4
2.2 Transmissão de <i>Fusarium oxysporum</i> através das sementes.....	6
2.3 Restrição Hídrica em relação a sementes e fungos.....	7
2.3.1 Aplicação da restrição hídrica no condicionamento de sementes.....	7
2.3.2 Uso de restrição hídrica no desenvolvimento de fungos em meio agarizado ajustado osmoticamente.....	9
2.4 Métodos de inoculação de fungos em sementes.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Obtenção e Manutenção dos isolados de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	16
3.2 Origem e Perfil das sementes.....	17
3.3 Preparo do inóculo de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	17
3.4 Preparo do meio BSA modificado.....	18
3.5 Crescimento micelial de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> em meio BSA modificado.....	18
3.6 Inoculação de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> em sementes de feijoeiro através da restrição hídrica.....	19
3.7 Avaliação da qualidade fisiológica e sanitária das sementes inoculadas com <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> através da restrição hídrica.....	19
3.7.1 Teste de germinação em rolo de papel.....	19
3.7.2 Emergência de plântulas e Índice de Velocidade de Emergência (IVE).....	20
3.7.3 Teste de Sanidade.....	20

3.8 Avaliação do desenvolvimento de plantas oriundas das sementes inoculadas com <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> através da restrição hídrica, em ensaio conduzido em câmara de crescimento vegetal.....	21
3.8.1 Área foliar.....	21
3.8.2 Altura de plantas.....	22
3.8.3 Peso seco de plantas e raízes.....	22
3.9 Delineamento Experimental.....	22
3.10 Análise Estatística.....	23
4 RESULTADOS.....	24
4.1 Crescimento Micelial de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> em meio BSA modificado.....	24
4.2 Qualidade sanitária e fisiológica das sementes de feijoeiro inoculadas com <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> através da técnica de restrição hídrica.....	25
4.2.1 Germinação em rolo de papel.....	25
4.2.2 Emergência de plântulas.....	27
4.2.3 Índice de Velocidade de Emergência - IVE.....	30
4.2.4 Incidência de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> em sementes de feijoeiro após inoculação.....	32
4.2.5 Ocorrência de outros microrganismos nas sementes de feijoeiro após inoculação de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i>	34
4.3 Avaliação do desenvolvimento das plantas oriundas das sementes inoculadas com <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> sob restrição hídrica, em ensaio conduzido em câmara de crescimento vegetal.....	34
4.3.1 Área foliar.....	34
4.3.2 Altura de plantas.....	36
4.3.3 Peso de planta e raiz.....	38
4.4 Relação entre emergência de plântulas e incidência de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> nas sementes de feijoeiro após inoculação.....	41

5 DISCUSSÃO.....	42
6 CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
ANEXOS.....	55

RESUMO

COSTA, Maria Luiza Nunes. **Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* por meio da restrição hídrica.** Lavras: UFLA, 2000. 71p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia)*.

Em diversos estudos sobre a associação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* com sementes de feijoeiro, há necessidade de disponibilização de sementes com o inóculo, inclusive com graus de incidência diferenciados. Assim, o objetivo deste trabalho foi testar metodologia de inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro para as quais se utilizam solutos que proporcionam restrição hídrica em meios agarizados, fazendo com que as sementes absorvam água, porém não germinam nestas circunstâncias. Foram utilizados três solutos, sacarose, cloreto de potássio e manitol, adicionados ao meio BSA (batata-sacarose-ágar) em três potenciais de restrição hídrica (-0.8, -1.0, -1.2 MPa) e quatro tempos de exposição das sementes sobre o fungo (36, 72, 108 e 144h). Para avaliar os efeitos do fungo nas sementes e nas plântulas emergentes, utilizaram-se testes de germinação, sanidade (blotter-test), vigor (índice de velocidade de emergência e emergência de plântulas), altura de plantas, área foliar e peso de parte aérea e de raiz. O crescimento micelial do fungo foi avaliado *in vitro*, não havendo inibição em nenhum dos potenciais e produtos utilizados, observando-se maior crescimento nos potenciais -0.8 e -1.0 MPa. Nos maiores períodos de tempo, 108 e 144h, o crescimento micelial foi maior, afetando o desempenho das sementes. Dentre os solutos utilizados, KCl proporcionou uma incidência média de 64% do fungo nas sementes. Quando as sementes permaneceram por 144h sobre o mesmo soluto, a incidência foi de 70%.

*Comitê Orientador: Prof. José da Cruz Machado – UFLA (Orientador)
Prof. Renato Mendes Guimarães – UFLA.

ABSTRACT

COSTA, Maria Luiza Nunes. **Inoculation of *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* by means of water restriction.** Lavras: UFLA, 2000. 71 p. (Dissertation – Master in Phytopathology).*

In this work the objective was to test methodology of inoculation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in bean seeds using water restriction technique. For that, three solutes, saccharose, potassium chloride and manitol, added to the BSA medium (potato-sucrose-agar) at three water restriction potentials (-0.8, -1.0, -1.2 MPa) and four times of the exposition of seeds to the fungus (36, 72, 108 and 144h) were used. The effects of the fungus on the performance of the seeds and emerged plants were evaluated looking at vigor germination, health (*blotter-test*) plant height, leaf area and weight of the shoot and root. The mycelial growth of the fungus evaluated *in vitro*, was not reduced by any osmotic treatment. Higher growth of the fungus was observed at potentials of -0.8 e -1.0 MPa. At longer periods of exposition of the seeds to the pathogen, 108 e 144h, mycelial growth of the fungus was higher and affected seed performance. Mean incidence of 64% of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* was detected on seeds in wich KCl was used. At 144h of inoculation period on that solute, the incidence was of 70%.

*Guidance Committee : Professor José da Cruz Machado - UFLA (Adviser)
Professor Renato Mendes Guimarães

1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos principais alimentos da dieta da população brasileira, sendo uma importante fonte de proteína e apresentando uma boa adaptação em diferentes condições climáticas.

O feijoeiro é ainda considerado uma cultura de subsistência, sendo cultivado por pequenos e médios agricultores. Devido à baixa tecnologia utilizada pela maioria, tem-se uma produtividade ainda baixa.

Tecnologias disponíveis aos produtores, como utilização de cultivares melhoradas, uso de sementes certificadas, plantio sob irrigação, proporcionam aumento substancial na produtividade e, conseqüentemente, maiores ganhos com a cultura.

O Brasil é o maior produtor de feijão (gênero *Phaseolus*) do mundo, seguido pelo México, destacando-se também, na safra de 1998/99, os EUA, a África, a Índia e a China. Em termos nacionais, a maior produção é obtida na região nordeste, seguida pelas regiões sul e sudeste.

Algumas regiões brasileiras produtoras possuem três safras anuais, o que garante produção todo o ano. A produção ainda é, insuficiente para abastecer o mercado interno, havendo necessidade de importação.

Tanto os pequenos produtores quanto os mais tecnificados estão sujeitos a perdas na produção devido a fatores fitossanitários. Alguns patógenos podem estar presentes numa área devido a culturas anteriores, oriundos de implementos agrícolas, e principalmente de sementes portadoras do patógeno, o que proporciona o desenvolvimento de inúmeros patógenos no solo em que permanecem por longos anos.

As sementes têm papel vital no desenvolvimento de um grande número de espécies utilizadas para produção de alimentos e outras finalidades importantes para o homem.

Especificamente nas sementes, a ocorrência de determinados patógenos, mesmo em taxas relativamente baixas, pode gerar grandes perdas na produção, como é o caso de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, agente etiológico da murcha ou amarelecimento de *Fusarium* em feijoeiro.

A murcha de *Fusarium* é uma das doenças do feijoeiro que vêm se destacando pelos grandes danos que causam. Estas perdas dependem de alguns fatores, como variedade utilizada, área com plantios sucessivos de feijão, cultivo irrigado (pivô central), controle preventivo, características climáticas e, principalmente, da qualidade sanitária das sementes.

A incidência deste patógeno nos grãos e sementes de feijoeiro produzidas em algumas regiões do país vêm aumentando nos últimos anos, em razão do uso, por parte dos produtores, de grãos em substituição às sementes (Pereira, 1999). Nestes casos, além da baixa germinação e vigor, as sementes possuem sanidade desconhecida.

Fusarium oxysporum f. sp. *phaseoli* é um microrganismo que sobrevive no solo, é transmitido por sementes, sobrevivendo em seu interior, em impurezas associadas às sementes e em restos de cultura (Machado, 1999). Desta forma, o controle da referida doença torna-se extremamente difícil e muitas vezes impossibilitado. Do ponto de vista epidemiológico, a associação desse fungo com sementes é um fato relevante, sendo responsável pela introdução e disseminação de inóculo inicial entre regiões de cultivo.

A diagnose preventiva no estágio de sementes, assim como o tratamento das sementes visando a erradicação do inóculo infectivo, são medidas que podem, portanto, auxiliar em grande escala o combate a este tipo de doença.

Para auxiliar os estudos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* associados às sementes, há necessidade, porém, de disponibilização de sementes com o inóculo, inclusive em graus de incidência diferenciados. Estas sementes são importantes em estudos, como: detecção do patógeno na semente,

desenvolvimento e testes de produtos preventivos e curativos no controle da doença, ensaios de melhoramento visando a resistência ou tolerância ao patógeno, e trabalhos sobre o comportamento epidemiológico de doenças.

Entretanto, sabe-se que as técnicas de inoculação de sementes comumente utilizadas são baseadas, em sua maioria, na imersão de sementes em suspensão de conídios, sendo as sementes mantidas em contato prolongado com meio líquido. Por esta metodologia, obtêm-se sementes apenas contaminadas e com viabilidade pós-inoculação muito reduzida.

O objetivo principal deste trabalho é obter sementes de feijoeiro infectadas por *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* usando a técnica de restrição hídrica na metodologia de inoculação. A hipótese lançada é que por meio da restrição hídrica as sementes tornam-se infectadas e podem, assim, ser utilizadas por um período maior em comparação com a técnica de inoculação por meio de embebição das sementes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Murcha ou amarelecimento de *Fusarium*

Murcha ou amarelecimento do feijoeiro é uma doença causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, que produz microconídios, macroconídios e clamidosporos; os microconídios são unicelulares produzidos em fiálides curtas, situadas diretamente nas hifas, os macroconídios são curvos com extremidades ponteagudas.

A doença caracteriza-se na lavoura, inicialmente, pelo aparecimento de plantas infectadas em reboleiras, identificadas pelo sintoma de murcha, podendo ocorrer amarelecimento das folhas antes da murcha. Apresenta atuação ascendente nas plantas, provocando queda das folhas em função da obstrução do sistema vascular, podendo causar a morte do hospedeiro (Kendrich & Snyder, 1942). Quando a infecção ocorre precocemente, pode haver redução do crescimento. Sintoma característico da doença pode ser observado através de corte longitudinal no caule, na raiz, onde verifica-se escurecimento vascular devido à colonização do patógeno (Ribeiro Do Vale & Zambolim, 1997).

O patógeno é disseminado dentro e entre lavouras através de movimento do solo infestado, restos culturais, água de irrigação, sementes contaminadas, homem e equipamentos agrícolas (Kraft *et al*, 1981).

A rapidez com que os sintomas aparecem no campo depende da quantidade de inóculo no solo, da cultivar e das condições climáticas, notadamente temperatura e umidade. Geralmente, os primeiros sintomas evidentes da doença no campo ocorrem na fase de prefloração ou floração e/ou enchimento dos grãos (Ribeiro Do Vale & Zambolim, 1997).

A murcha ou amarelecimento de *Fusarium* vem apresentando, nos últimos anos, uma importância acentuada no Brasil, notadamente em áreas de cultivo sob irrigação (pivô central), onde geralmente se fazem plantios sucessivos de feijão. Severa epidemia da doença tem sido relatada onde estiagem e altas temperaturas são predominantes e contribuem para o aumento das perdas (Ribeiro Do Vale & Zambolim, 1997). As perdas ocasionadas pelo patógeno são variáveis, dependendo da cultivar utilizada, da qualidade sanitária das sementes, da infestação do solo e das características físico-químicas e biológicas do solo, dentre outros fatores. No Brasil, perdas de até 80% sob condições de campo já foram observadas (Ribeiro Do Vale & Zambolim, 1997; Menezes, 1987).

A doença foi relatada pela primeira vez em 1929, em campos de feijão localizados no Vale do Sacramento, na Califórnia, Estados Unidos da América. Reapareceu na mesma localidade em 1933 e 1940, quando a cultura foi novamente implantada nesta área (Kendrich & Snyder, 1942). A doença existe hoje, no Brasil, Costa Rica, Colômbia, Panamá, México, Peru, e Equador (Abawi & Pastor-Corrales, 1990) e também em países como a Itália, Índia, Argentina, Holanda, Egito, Espanha e outros.

Especificamente no caso do Brasil, o primeiro relato da doença foi feito por Cardoso *et al.* (1966) na região de Laranjal Paulista, São Paulo, e atualmente a doença está presente na maioria dos estados brasileiros onde o feijão é cultivado e, dentre estes, ela tem sido importante no Espírito Santo, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Rio de Janeiro, Pernambuco, Santa Catarina, Paraná e Bahia (Ribeiro Do Vale & Zambolim, 1997).

2.2 Transmissão de *Fusarium oxysporum* através das sementes

Muitos fungos transmitidos por sementes iniciam suas atividades por ocasião da semeadura, os quais podem resultar em diminuição do estande e/ou damping-off de pré ou pós-emergência (Agarwal & Sinclair, 1987).

Patógenos transportados por sementes podem não causar a morte de sementes e plântulas, mas afetarem o vigor das plantas. Esta debilitação pode ser causada por podridões radiculares (menor área para absorção de água e nutrientes e menor profundidade), bloqueio no transporte de água e nutrientes (lesões no colo e na haste, infecções vasculares, etc.), colonizações sistêmicas, etc. O resultado pode ser o desenvolvimento reduzido das plantas (tanto em altura como em volume/massa). Estas plantas pouco vigorosas são mais sensíveis a qualquer tipo de estresse (seca, alta umidade, alta ou baixa temperatura) e mais vulneráveis ao ataque de outras doenças e pragas (Menten, 1991).

Kendrick & Snyder (1942) relataram a presença de *Fusarium oxysporum* externamente às sementes de feijoeiro, como resultado da aderência dos esporos à superfície das mesmas no momento da colheita.

A presença de *Fusarium oxysporum* nas sementes de feijoeiro foi relatada posteriormente por Tuset Barrachina (1973) e Winter *et al.* (1974), na Argentina, em levantamento de microrganismos associados às sementes de culturas de importância econômica naquele país.

No Brasil, os relatos da presença de *Fusarium oxysporum* nas sementes de feijoeiro foram feitos por Lasca (1978), avaliando a flora fúngica de sementes produzidas no estado de São Paulo; por Menezes *et al.* (1978, 1981), em avaliação da qualidade sanitária de sementes de feijoeiro produzidas no estado do Paraná; por Amaral (1981), que relata os patógenos causadores de doenças no feijoeiro e que são transmitidas por semente; por Leal e Bolkan, (1981), que

verificaram a incidência de *Fusarium* spp. em lotes de sementes de 50 cultivares, no estado de Goiás; por Nunes Jr. & Menten (1985), verificando a flora fúngica de sementes produzidas no estado de Santa Catarina; e por Santos *et al.* (1996), em Minas Gerais, enquanto trabalhavam na detecção de fungos em sementes, sua transmissibilidade e patogenicidade.

A presença de *Fusarium oxysporum* nas sementes de feijoeiro não apresenta sintomas característicos (Menten, 1987), mas as consequências são visíveis. Diretamente nas sementes eles causam apodrecimento parcial ou total, diminuindo o porcentual de germinação e emergência no campo, contribuindo para a redução do estande (Menezes *et al.* 1978, 1981; Menten, 1991). Consequentemente, há uma necessidade de utilização excessiva de sementes para obter o stand desejável, aumentando, por conseguinte, o inóculo no campo.

O vigor das plantas oriundas de sementes com o patógeno também fica comprometido, sendo comum o reduzido desenvolvimento da planta tanto em altura quanto em massa (peso), vulnerabilidade ao ataque de outras doenças e pragas, mais sensibilidade ao estresse (seca, alta umidade, temperaturas altas ou baixas) (Machado, 1988; Menten, 1991). Estimam-se também efeitos no peso seco e área foliar total da planta (Bergamin Filho, 1996).

Sabe-se também que o efeito da doença na produção varia de acordo com a época em que a planta foi infectada, por isso se deve, sempre, considerar o estágio de desenvolvimento do hospedeiro (Bergamin Filho & Amorin, 1996).

2.3 Restrição hídrica em relação a sementes e fungos

2.3.1 Aplicação da restrição hídrica no condicionamento de sementes

O condicionamento osmótico é uma forma de promover restrição hídrica, é aplicado às sementes e foi desenvolvido por Heydecker *et al.*

(1973/75). Esta técnica consiste em submeter as sementes a um período de pré-embebição, para que depois suas radículas possam emergir mais rapidamente que o normal.

Na técnica do condicionamento osmótico, as sementes são colocadas em contato com a solução aquosa de uma substância quimicamente inerte, iniciando a embebição de água normalmente, cessando este processo assim que entram em equilíbrio com o potencial osmótico da solução. Esse potencial é pré-determinado e, conseqüentemente, o conteúdo de água da semente pode ser ajustado a um nível que permite a passagem por todas as fases preparatórias essenciais à germinação (fases I e II) sem atingir a fase de alongamento celular e a emergência da raiz primária (fase III), mesmo após semanas de contato entre a semente e a solução osmótica (Heydecker *et al.*, 1973/75).

De acordo com Bewley & Black (1983), a fase I é rápida e ocorre em consequência da diferença de potencial hídrico semente/solo. Bioquimicamente, a fase I caracteriza-se pela degradação das substâncias de reserva. Ao atingir determinados teores de água, próprios de cada espécie, tem início a fase II, na qual ocorre o transporte ativo das substâncias desdobradas na fase anterior. Durante a Fase II, os potenciais hídricos do solo (ou outro substrato) e da semente estariam bastante próximos, de modo que as sementes praticamente estabilizam a absorção de água, exibindo acréscimos pouco evidentes em seu grau de umidade (Carvalho & Nagakawa, 1988). Em seguida observa-se o crescimento visível do eixo embrionário, caracterizando o início da fase III da geminação e a retomada da absorção de quantidades crescentes de água.

O tratamento em condições favoráveis permite o desdobramento de reservas alimentícias necessárias à germinação, possibilitando que as sementes germinem mais rapidamente assim que o obstáculo à embebição seja removido, isto é, quando as sementes são transferidas da solução osmótica para substrato ou solo suficientemente úmido (Heydecker *et al.*, 1975).

Para a maioria das espécies, a melhor temperatura para o condicionamento osmótico varia entre 10 e 20°C (Bewley & Black, 1985). Para feijão, Pandey (1988/89) encontrou bons resultados a 25° C: para soja, 15°C (Knypl & Khan, 1981).

Alguns dos efeitos observados com o processo de condicionamento das sementes são: a) aumento da velocidade e/ou porcentagem de germinação em sementes, caso de cenoura e cebola, usando como soluto de restrição hídrica o PEG 6000 a 15° C por 14 dias (Heydecker *et al.*, 1975) e sementes de feijão em soluções com 20 a 26% de PEG 6000 (Fu *et al.*, 1983; b) maior sincronização do processo de germinação entre sementes de mesmo lote (Heydecker *et al.*, 1975; Khan *et al.*, 1980/81), em sementes de soja osmocondicionadas com PEG (Helsel *et al.*, 1986); c) aumento da velocidade de emergência das plântulas (Heydecker *et al.*, 1975; Khan *et al.*, 1980/81), em sementes de soja osmocondicionadas com PEG (Helsel *et al.*, 1986); d) reparo das membranas celulares diminuindo os efeitos da deterioração, em sementes de soja embebidas em rolos de papel umedecidos com 30% de PEG 4000 por 8 horas (Woodstock & Tao, 1981) e em sementes de soja condicionadas com PEG a 40% por 24 a 48 horas (Meng & Li, 1992); e) aumento do vigor (Khan *et al.*, 1976) em sementes de soja condicionadas com 30-36% de PEG 6000 e sementes de amendoim e feijão com 20 a 26% de PEG 6000 (Fu *et al.*, 1983).

2.3.2 Uso da restrição hídrica no desenvolvimento de fungos em meio agarizado ajustado osmoticamente

Potencial hídrico é uma expressão da energia da água e essa energia determina a sua disponibilidade para processos vitais. Comumente, o potencial hídrico é expresso por bar ou MPa (Mega Pascal), equivalendo 1 bar a 0,1 MPa e a 0.987 atm (Cook & Papendick, 1978). Para o crescimento e atividade dos

microrganismos e para a maioria, se não todas as funções celulares, é importante considerar a energia relativa da água.

Para descrever o teor de água no solo, utilizam-se os termos capacidade de campo e ponto de murcha permanente. Pressão de vapor e umidade relativa referem-se à água no ar. Pressão osmótica designa água nos tecidos das plantas e atividade de água expressa a água nas sementes e alimentos secos (Cook & Papendick, 1978).

A água possui três estágios de energia, podendo estar livre (disponível para utilização), sob pressão ou presa (menos disponível). Quando está livre, o seu potencial é igual a zero; quando está sob pressão, torna-se positivo (turgor das células; dentro de uma seringa), e quando está menos disponível (nos tecidos das plantas, em microrganismos, no solo ou outros substratos), seu potencial atinge valores negativos (Cook & Papendick, 1978).

O potencial hídrico total pode ser dividido em: a) potencial osmótico, que se deve aos solutos (sempre negativo); b) potencial gravitacional, causado por diferenças de altitude (positivo ou negativo); c) potencial mátrico ou de capilaridade, que inclui ambos os efeitos de capilaridade e adsorção das fases sólidas, tais como material mineral ou orgânico (sempre negativo); d) potencial de pressão, que resulta da pressão externa aplicada à água do solo (positiva ou negativa). O potencial hídrico total de uma célula viva é a soma dos potenciais osmótico (negativo), mátrico (negativo) e turgor (positivo). Em célula túrgida, o componente mátrico é insignificante se comparado ao componente osmótico (Cook & Papendick, 1972).

As células bacterianas e as hifas fúngicas têm o potencial hídrico (ψ) semelhante ao das outras células, incluindo os potenciais osmóticos e de turgor. Estes microrganismos, desenvolvendo-se no solo ou em outro substrato, tendem a equilibrar o potencial hídrico total das suas células com o ambiente externo. Da mesma forma, se o potencial hídrico das células dos microrganismos for

maior, haverá perda de água para o ambiente, até atingir o equilíbrio, podendo haver perda do turgor das células, e, inclusive, resultar em dessecação e morte das células (Cook & Papendick, 1972).

Alguns microrganismos podem sobreviver na forma de esporos dormentes ou corpos de resistência, e desenvolver um menor potencial osmótico por osmoregulação (diminuição ou aumento do potencial osmótico dentro da célula) (Cook & Papendick, 1978).

Osmoregulação é, provavelmente, um importante mecanismo pelo qual os microrganismos mantêm turgor e equilíbrio do potencial hídrico entre suas células e entre o ambiente. Este processo pode explicar porque os organismos diferem em requerimento do potencial hídrico de acordo com a espécie, ambiente e nutrição (Cook & Papendick, 1978).

Potencial mátrico é o principal componente do potencial hídrico do solo (Cook & Duniway, 1981; Manandhar & Bruehl, 1973). Temperatura e potencial hídrico do solo são reconhecidos como importantes fatores em doenças causadas por *Fusarium* spp. Entretanto, existem poucos relatos do efeito do potencial mátrico (ψ_m) em relação a *Fusarium* spp, bem como sobre a influência do ψ_m no crescimento de hifas através de solo não estéril (Brownell & Schneider, 1985).

Geralmente, bactérias e fungos têm seu crescimento máximo em potenciais hídricos em torno de -0.3 a -0.5 MPa, havendo reduções do crescimento em -4 a -5 MPa. Estes valores variam com os microrganismos. Por exemplo, *Pythium* spp requer um maior potencial hídrico para crescimento e é geralmente comprometido em potenciais abaixo de -3 a -4 MPa. Ao contrário, fungos do gênero *Fusarium* podem crescer em potenciais hídricos abaixo de -10.0 a -12.0 MPa e algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* podem crescer em potenciais hídricos menores que -22 a -25 MPa (Cook & Papendick, 1978).

Para a maior parte dos organismos, a necessidade exata de potencial hídrico é ainda desconhecido, mas há evidências de que os organismos diferem

uns dos outros nesse aspecto. Mas sabe-se que o requerimento hídrico de um dado organismo varia com a temperatura, pH, nutrição, entre outros. Em geral, quanto mais favorável for a nutrição e o ambiente, menor o potencial hídrico em que o organismo pode crescer (Cook & Papendick, 1978).

A maior parte dos trabalhos sobre a influência do potencial hídrico no crescimento fúngico tem sido feita utilizando meio agarizado controlado osmoticamente (Cook & Duniway, 1981; Wearing & Burgess, 1979; Cook *et al.*, 1972; Chandler *et al.*, 1994; Alam *et al.*, 1996; Adebayo & Harris, 1971; Brownell & Schneider, 1985). Diversos meios agarizados podem ser utilizados, sendo o BDA (Batata-Dextrose-Ágar) o mais comum. Wearing & Burgess (1979) avaliaram o crescimento de *Fusarium roseum* “Graminearum” em vários meios e citam, em seu trabalho, os potenciais osmóticos de alguns meios básicos: -0.36 MPa para BDA (Batata-Dextrose-Ágar), -0.12 MPa para NA (Nutriente Ágar), -0.25 MPa para V₈ A (V₈ Juice Ágar), -0.48 MPa para MEA (Extrato de Malte Ágar) e -0.1 MPa para SEA (Extrato de Solo Ágar), sem adição de solutos.

A adição de sacarose ao meio agarizado proporcionou maior crescimento micelial de *Phytophthora cinnamomi* e *Alternaria tenuis* que a adição de KCl ao meio agarizado, provavelmente devido à melhor disponibilidade do carbono da sacarose (Adebayo & Harris, 1971).

Cook *et al.* (1972) avaliaram crescimento de *Ophiobolus graminis* e *Fusarium roseum* f. sp. *cerealis* ‘Culmorum’ em meio agarizado controlando potencial hídrico osmoticamente, utilizando como solutos a sacarose, KCl, NaCl, a mistura dos dois sais e Na₂SO₄, em várias concentrações. Para o primeiro fungo, observou-se diminuição no crescimento micelial à medida que aumentava a restrição hídrica. O contrário ocorreu com o *Fusarium roseum* f. sp. *cerealis* ‘Culmorum’, pois seu crescimento foi estimulado à medida que aumentava a restrição hídrica, com todos os solutos utilizados, até atingir o

potencial -0.8 MPa. O crescimento micelial diminuiu abaixo de -0.8 a -0.1 MPa, reduzindo o crescimento pela metade no potencial -5 MPa e cessou o crescimento a -8 MPa.

Por sua vez, estudos de Wearing & Burgess (1979) demonstraram que crescimento de *Fusarium roseum* "Graminearum", grupos 1 e 2, foi estimulado em meio agarizado com potenciais hídricos de -0.36 a aproximadamente -1.0 e -2.0 MPa produzidos por sacarose, KCl, NaCl, a mistura de KCl+NaCl e Na₂SO₄. Houve ainda crescimento no potencial -12.3 MPa, cessando entre -14.0 e -15.0 MPa na temperatura de 25°C. Citam os autores que o fungo paralisou crescimento em potenciais maiores que -12.0 MPa devido à limitação de nutriente do meio utilizado.

O crescimento micelial do *Fusarium* é, em geral, intensificado em meios de cultura com potenciais hídricos mais negativos, havendo crescimento normal até -3.0 MPa. Abaixo disso, no entanto, há uma progressiva diminuição, mas seu desenvolvimento tolera até -9.0 a -12.0 MPa. Estes potenciais estão bem abaixo dos suportados pelas plantas hospedeiras, -1.5 MPa (-15 bars) (Ioannou *et al.*, 1977; Manandhar & Bruehl, 1973).

A temperatura ideal de crescimento de *Fusarium* situa-se na faixa de 24-32°C, havendo, no entanto, crescimento a 35°C, quando o potencial hídrico é diminuído (Manandhar & Bruehl, 1973; Nash & Pieper, 1972 citado por Puhalla & Bell, 1981)

Brownell & Schneider (1985) observaram que o crescimento de *Fusarium oxysporum* em meio agarizado controlado osmoticamente com KCl e MgCl₂ teve seu crescimento estimulado ao diminuir o potencial hídrico de -0.8 para -1.5 MPa. O crescimento foi reduzido 50% a -6 e -2.7 MPa em meio ajustado com KCl e MgCl₂, respectivamente. E a -9 MPa, o crescimento em meio ajustado com KCl ficou em 27% do crescimento máximo. Nos meios em que foram utilizados solutos, o crescimento radial foi maior que na testemunha

(meio sem adição de solutos) em todas as temperaturas testadas (15, 21, 24, 30, 33, 36°C), no período de 4 a 7 dias.

O soluto KCl permite ao fungo crescer em potenciais osmóticos relativamente baixos, pois ions potássio são facilmente acumulados pelas células microbianas e possuem baixa toxicidade (Harris, 1981; citado por Brownell & Schneider, 1985).

2.4 Métodos de inoculação de fungos em sementes

Sementes geralmente são inoculadas para diversas finalidades, como, por exemplo, estudos envolvendo patogenicidade, resistência de cultivares a determinados patógenos (Agarwal & Sinclair, 1981), avaliação da eficácia do tratamento com produtos, dentre outras modalidades.

Mesterhazy (1978) inoculou sementes de trigo para testar resistência ao *Fusarium* spp. utilizando o método do papel de filtro. Uma camada dupla de papel de filtro é imersa em suspensão de esporos e colocada em placas estéreis. Sementes desinfestadas superficialmente foram colocadas sobre o papel e incubadas. Após alguns dias, as plântulas são avaliadas para resistência.

A inoculação de sementes pela aplicação de vácuo é utilizada com resultados semelhantes à utilização de agitação (Leukel, 1936). Esta metodologia consiste em adicionar 250g de sementes a 1 L de suspensão de esporos, 1% de dextrose ou caldo de batata-dextrose e aplicar o vácuo de aproximadamente 100-120 mmHg por 10 a 20 min. Após retirada a suspensão de esporos, as sementes são deixadas para secar por 12h aproximadamente e então são mantidas a 90% de umidade relativa por 2 dias, à temperatura de 20 a 25°C. Após este processo, as sementes são secas com auxílio de ar forçado e armazenadas até o momento da utilização. De forma semelhante, Chaves *et al.* (1999) utilizaram metodologia de inoculação por imersão a vácuo por 3 minutos

com suspensão contendo 2×10^6 conídios/mL de *Colletotrichum* sp. em sementes de feijoeiro.

Carvalho (1989) utilizou *Fusarium oxysporum* isolado de sementes produzidas na região sul de Minas Gerais para testar inoculação em sementes. A inoculação consiste em colocar o inóculo sobre as sementes, distribuídas em bandejas contendo mistura de terra e areia, e em seguida fazer a cobertura com o mesmo substrato. As bandejas foram mantidas sob temperatura de 19-23°C e fotoperíodo de 12 horas. Após 24 dias, observaram-se sintomas.

Outra metodologia de inoculação de fungos em sementes sobre meio BDA foi desenvolvida por Carvalho (1999) utilizando a técnica de restrição hídrica. Através desta técnica, o potencial hídrico do meio agarizado é controlado com manitol e/ou PEG, para que as sementes não germinem durante a exposição das mesmas com o fungo em desenvolvimento. Foram inoculadas sementes de feijoeiro com *Colletotrichum lindemuthianum* em meio BDA controlado osmoticamente com manitol e PEG, em diferentes potenciais de restrição hídrica (-0.8 e -1.0 MPa) e em diferentes períodos de tempo (30, 72, 120 e 168h).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos nos laboratórios de Patologia de Sementes, Departamento de Fitopatologia e de Análise de Sementes, Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, no período de dezembro/1999 a junho/2000.

3.1. Obtenção e manutenção de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* foram obtidos de sementes de feijoeiro, referentes a lotes existentes no laboratório de Patologia de Sementes. Isolamentos das culturas desenvolvidas foram efetuados a partir de sementes submetidas ao *blotter-test* (Machado, 1988). As culturas puras dos isolados obtidos cresceram em meio SNA (Synthetic Nutrient Ágar, Niremberg, 1981) e, em seguida, foram transferidas para meio de aveia até o momento de sua utilização.

A patogenicidade dos isolados obtidos foi testada através de inoculações em plântulas oriundas de sementes da cultivar IPA 1 fornecida pelo Departamento de Biologia da UFLA. As plântulas desenvolveram-se em bandejas contendo areia como substrato, por 10 dias. Em seguida, foram retiradas e lavadas em água corrente e tiveram 1/3 das suas raízes cortadas. As raízes das plântulas foram mergulhadas em suspensão de esporos na concentração de 10^6 conídios/mL, por 5 minutos. Após inoculação, foram plantadas em vasos contendo uma mistura de areia, terra e esterco (proporção de 3:2:2), previamente esterilizadas com brometo de metila.

As avaliações foram realizadas aos 21 dias após a inoculação utilizando critérios descritos por Rava *et al.* (1996). O isolado considerado mais patogênico às plantas foi reisolado e utilizado nos experimentos deste trabalho.

O isolado foi mantido a 10°C em tubos contendo mistura de solo-areia-composto orgânico, previamente esterilizados.

3.2. Origem e Perfil das sementes

As sementes de feijoeiro cv carioca, safra 1999, foram obtidas no Departamento de Agricultura da UFLA e armazenadas em câmara fria.

Inicialmente procedeu-se a seleção das sementes, sendo utilizadas as que ficaram retidas na peneira 14. Posteriormente, realizaram-se análises verificando a qualidade fisiológica através dos testes de germinação e vigor (tetrázólio), sendo as avaliações realizadas de acordo com os critérios estabelecidos pelas Regras de Análise de Sementes (Brasil, 1992) (Tabela 1B, 2B). A qualidade sanitária das sementes foi verificada através do *blotter-test* (Tabela 3B).

3.3 Preparo do inóculo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

O fungo foi cultivado em meio de aveia cujas placas foram colocadas em câmara de crescimento a 20°C por 7-10 dias, quando ocorreu esporulação suficiente para preparo de suspensão de conídios. A suspensão foi preparada adicionando 5 mL de água destilada esterilizada às placas e agitando-as levemente para a liberação dos conídios. A suspensão foi colocada em becker, homogeneizada e calibrada para a concentração de 1×10^6 conídios/mL, através da utilização da câmara de Neubauer.

3.4 Preparo do meio BSA modificado

O meio BSA modificado (meio com restrição hídrica) foi preparado pela adição dos solutos, sacarose, cloreto de potássio e manitol ao meio BSA (batata, sacarose, ágar). Para cada soluto utilizado, foram preparadas 3 concentrações diferentes, de modo a proporcionar restrição hídrica de -0.8, -1.0 e -1.2 MPa.

O cálculo das concentrações dos solutos de restrição hídrica foi realizado pelo software SPPM (Michel & Radcliffe, 1995) (Tabela 4B).

3.5 Crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em meio BSA modificado

O meio BSA modificado (descrito no item 3.4) foi vertido em placas de Petri de 10 cm de diâmetro. Ao centro, colocou-se um disco de 5 mm de diâmetro, de meio SNA contendo o fungo cultivado por 7 dias, à temperatura de 20°C e fotoperíodo de 12h. Em seguida, as placas foram acondicionadas em incubadora BOD regulada a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas, durante 8 dias.

O diâmetro médio das colônias foi avaliado diariamente e o índice de crescimento micelial - ICM - foi determinado através da fórmula descrita por Oliveira (1991):

$$ICM = C_1/N_1 + C_2/N_2 + \dots + C_n/N_n$$

ICM = Índice de Crescimento Micelial

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

N_1 , N_2 e N_n = número de dias de avaliação

3.6 Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através da restrição hídrica

Neste experimento utilizaram-se placas de Petri de 15 cm contendo 40 mL de meio BSA modificado. Sobre o meio foi distribuído uniformemente 1mL de suspensão de conídios de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, sendo as placas incubadas em BOD reguladas à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Após o crescimento micelial do fungo por 5 dias, foram colocadas 125 sementes em cada placa, e novamente incubadas nas mesmas condições.

As sementes permaneceram sobre a colônia fúngica por 4 períodos de tempo (36, 72, 108 e 144h) para cada agente condicionante e para cada concentração.

Após o término dos períodos de exposição a *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, as sementes foram retiradas das placas e distribuídas sobre papel de filtro, em temperatura ambiente para retornarem ao teor de umidade inicial. Após 3 dias, as sementes foram colocadas em sacos de papel e armazenadas em câmara fria, onde permaneceram até o momento das avaliações.

3.7 Avaliação da qualidade fisiológica e sanitária das sementes inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* através da restrição hídrica

3.7.1 Teste de germinação em rolo de papel

Conduzido com 4 repetições de 50 sementes em papel germitest (papel-toalha) umedecido com água destilada esterilizada, 2,5 vezes o peso do papel seco, em germinador regulado à temperatura constante de 25°C +/-2°. As avaliações foram realizadas seguindo os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

3.7.2 Emergência de plântulas e Índice de velocidade de emergência -IVE

Neste ensaio montado em casa de vegetação telada, utilizou-se o plantio em vasos de 5L contendo 4 litros de solo, areia e esterco na proporção de 3:2:2, previamente esterilizados com brometo de metila. Cada parcela experimental era formada por um vaso, para o qual foram utilizadas oito sementes no momento da semeadura.

Para o cálculo do índice de velocidade de emergência, contou-se diariamente o número de plântulas emergidas até sua estabilização. O índice foi calculado pela fórmula de Maguire (1962):

$$IVE = E_1/N_1 + E_2/N_2 + \dots + E_n/N_n$$

IVE = Índice de Velocidade de Emergência

E_1, E_2 e E_n = nº de plantas emergidas na primeira, segunda e última contagem

N_1, N_2 e N_n = nº de dias de semeadura

A emergência total foi determinada aos 8 dias, quando houve estabilização da emergência de plântulas. O resultado foi expresso em porcentagem.

3.7.3 Teste de Sanidade

Utilizou-se o *blotter-test*, no qual as sementes foram incubadas em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo três folhas de papel de filtro esterilizadas e umedecidas com água destilada esterilizada. Adicionou-se o sal de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, concentração de 10 ppm, à água destilada para evitar a germinação das sementes no período de incubação. As placas foram

mantidas em câmara de crescimento sob luz negra (radiação na faixa de 320-400 nm), com fotoperíodo de 12 h, à temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, num período de 7 dias.

A visualização das sementes para identificação da micoflora foi realizada com a utilização do microscópio estereoscópico, e quando necessário, utilizou-se o microscópio ótico para confirmação das estruturas do fungo. Por este teste, detectou-se também a ocorrência dos demais microrganismos associados às sementes, utilizadas neste estudo.

3.8 Avaliação do desenvolvimento de plantas oriundas das sementes inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* através da restrição hídrica em ensaio conduzido em câmara de crescimento vegetal

O experimento foi montado em câmara de crescimento com temperatura de 25°C , fotoperíodo de 12h, constando de 36 tratamentos (3 solutos, 3 potenciais hídricos e 4 tempos), sendo montado em vasos plásticos de 500 mL contendo 400 mL de mistura de solo, areia e esterco na proporção de 3:2:2, previamente esterilizados com brometo de metila. Cada parcela constou de 1 vaso com 3 sementes, sendo 3 repetições por tratamento. Regas diárias foram realizadas durante o período de condução do ensaio. Foram avaliados área foliar, altura de plantas e peso de plantas e de raiz.

3.8.1 Área foliar

Para a obtenção da área foliar, mediu-se a largura do folíolo central da folha trifoliolada de cada planta aos 20 dias após o plantio. No cálculo da área foliar – AF, foi empregada a equação de Iamauti (1995) para o feijão:

LFC = largura do foliolo central

3.8.2 Altura de plantas

Determinada pela medida entre a base da haste até o ponto de inserção das folhas cotiledonares, aos 35 dias após o plantio, momento em que foi concluído o experimento.

3.8.3 Peso seco de plantas e raiz

As plantas foram cortadas a 1 cm do solo, embaladas em saco de papel e secas em estufa de circulação forçada de ar, temperatura de 70°C por três dias. Em seguida procedeu-se a pesagem.

O mesmo procedimento foi realizado com as raízes, após lavá-las em água corrente e secá-las à sombra.

Cada parcela experimental constou de três plantas e estas foram acondicionadas juntas em saco de papel. O mesmo procedimento foi adotado para as raízes.

3.9 Delineamento Experimental

Crescimento micelial

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 4 repetições em esquema fatorial 3x3, combinando soluto (sacarose, cloreto de potássio e manitol) com potencial (-0.8, -1.0, -1.2 MPa), sendo testemunha o crescimento em meio BSA.

Germinação e Sanidade

Nos testes de germinação e sanidade, utilizou-se o delineamento experimental em blocos casualizados com esquema fatorial $3 \times 3 \times 4 + 4$, no qual combinou-se soluto (sacarose, KCl e manitol), potencial (-0.8, -1.0 e -1.2 MPa) e tempo (36, 72, 108 e 144 horas) de permanência da semente sobre o fungo; e tratamento adicional, sementes inoculadas nos tempos 36, 72, 108 e 144h em meio BSA, no qual não variou produto nem potencial.

Emergência, Índice de Velocidade de Emergência, Área Foliar, Altura de plantas, Peso de plantas e de raiz

Utilizou-se o delineamento experimental em blocos casualizados, com esquema fatorial $3 \times 3 \times 4 + 5$, para o qual se combinou soluto (sacarose, KCl e manitol), três potenciais (-0.8, -1.0 e -1.2 MPa) e quatro tempos (36, 72, 108 e 144 horas) de permanência da semente sobre o fungo; e cinco tratamentos adicionais, um sem inoculação e quatro inoculados nos tempos 36, 72, 108 e 144h em meio BSA no qual não variou produto nem potencial.

3.10 Análise Estatística

As análises estatísticas dos experimentos foram realizadas utilizando os programas SISVAR e SAS. O contraste de médias para comparar tratamento com testemunhas parâmetros avaliados foi o teste de T.

As médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste Scott-Knott ou regressão de acordo com a natureza dos dados, quantitativos ou qualitativos.

Nas equações de regressão realizadas, foram calculados os pontos de máximo das curvas.

4 RESULTADOS

4.1 Crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em meio BSA modificado

Pelas análises estatísticas, o crescimento micelial do fungo não foi afetado pelos diferentes produtos de restrição hídrica, mas apresentou diferenças em relação a potenciais de restrição hídrica (Tabela 1A). Observou-se que a adição de sacarose, cloreto de potássio e/ou manitol até o potencial -0.92 MPa provocou aumento do crescimento do fungo em relação à testemunha. A partir deste potencial, o crescimento do *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* foi decrescente (Figura 1).

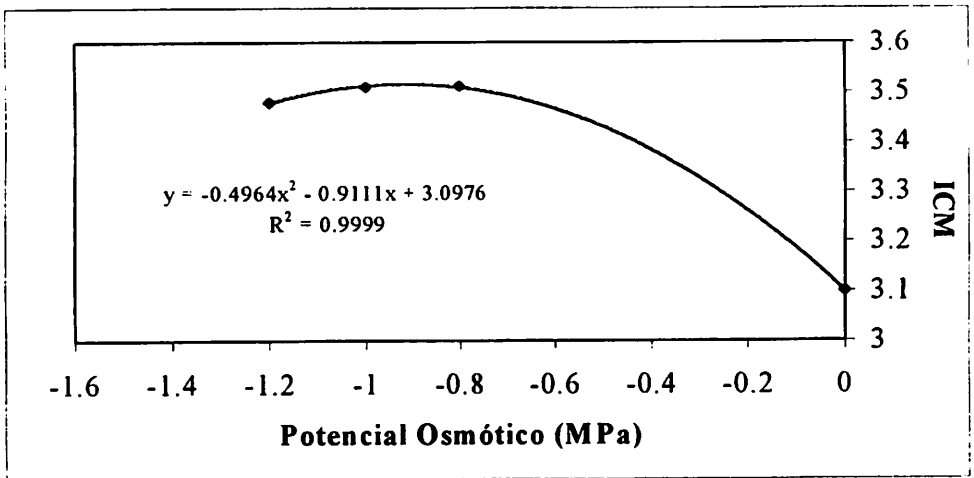


FIGURA 1: Análise de regressão para índice de crescimento micelial relacionado ao potencial de restrição hídrica de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* utilizando sacarose, KCl e manitol. UFLA, Lavras-MG, 2000.

4.2 Qualidade sanitária e fisiológica das sementes inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* através da técnica de restrição hídrica

4.2.1 Germinação em rolo de papel

De acordo com o contraste entre as médias de germinação das sementes nos tratamentos e na testemunha, observou-se melhor desempenho das sementes na testemunha, ou seja, porcentagem maior de germinação (Tabela 2A). Este resultado demonstrou que os tratamentos proporcionaram aumento do crescimento do fungo sobre as sementes, afetando a germinação.

Houve variação na germinação das sementes ao utilizar diferentes solutos (sacarose, cloreto de potássio e manitol), potenciais (-0.8,-1.0, -1.2 MPa) e tempos de exposição das sementes ao fungo (36, 72, 108, 144h) na inoculação de sementes com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Em termos de germinação, a interação das variáveis soluto, potencial e tempo não proporcionou diferença significativa na germinação, ao contrário das interações soluto e potencial, para as quais houve efeito significativo (Tabela 2A).

Comparando solutos pelo teste Scott-Knott, houve diminuição na germinação utilizando o meio modificado com KCl no potencial -1.2 MPa. Os meios de cultura modificados com sacarose e manitol para inoculação das sementes não afetaram a germinação nos potenciais utilizados (Tabela 1).

A germinação das sementes foi superior na inoculação sobre o meio BSA. Nos meios modificados com os solutos sacarose, cloreto de potássio e manitol, a germinação diminuiu à medida que aumentava o tempo de permanência das sementes sobre o meio de cultura (Figura 2).

Dentre os potenciais de restrição hídrica utilizados, -0.8 MPa foi o que menos afetou a germinação das sementes, nos três solutos utilizados. Com a utilização de KCl e manitol, a germinação diminuiu com o aumento da restrição

hídrica no meio de cultura; e no soluto sacarose, a germinação apresentou acréscimo no maior potencial de restrição hídrica (-1.2 MPa) (Figura 3).

TABELA 1: Média das porcentagens de germinação das sementes inoculadas com *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* em meio BSA modificado com sacarose, KCl e manitol. UFLA, Lavras-MG, 2000.

SOLUTO	POTENCIAL OSMÓTICO (MPa)				MÉDIA
	0.0	-0.8	-1.0	-1.2	
BSA + Sacarose	-	79.87 a	76.00 a	79.12 a	78.33
BSA + KCl	-	68.46 a	59.75 a	49.00 b	59.11
BSA + Manitol	-	79.75 a	79.25 a	75.12 a	78.04
					71.83*
BSA	85.5	-	-	-	85.5*

Médias seguidas das mesmas letras nas colunas são iguais pelo teste Scott-Knott Testemunha (BSA) superior ao tratamento pelo contraste entre médias (teste T)

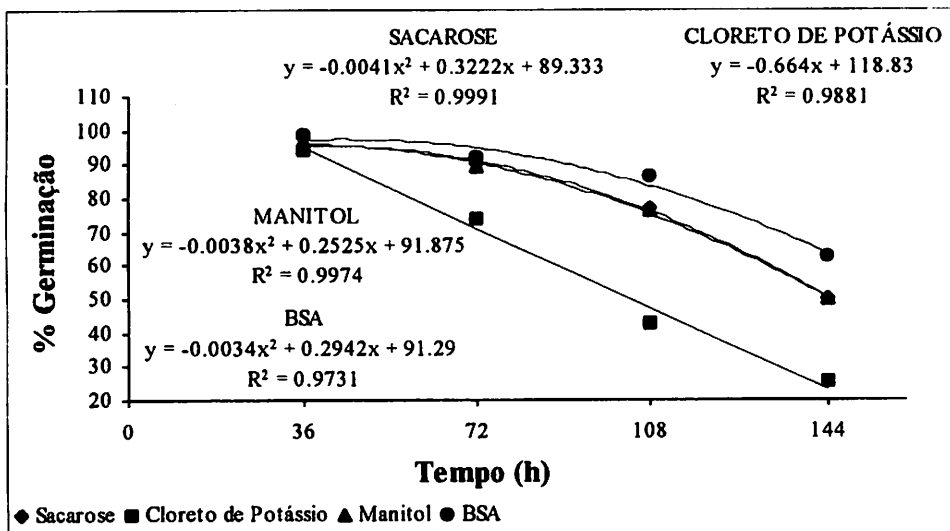


FIGURA 2: Regressão para % de germinação das sementes de feijoeiro inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em relação aos diferentes tempos de inoculação. UFLA, Lavras-MG, 2000.

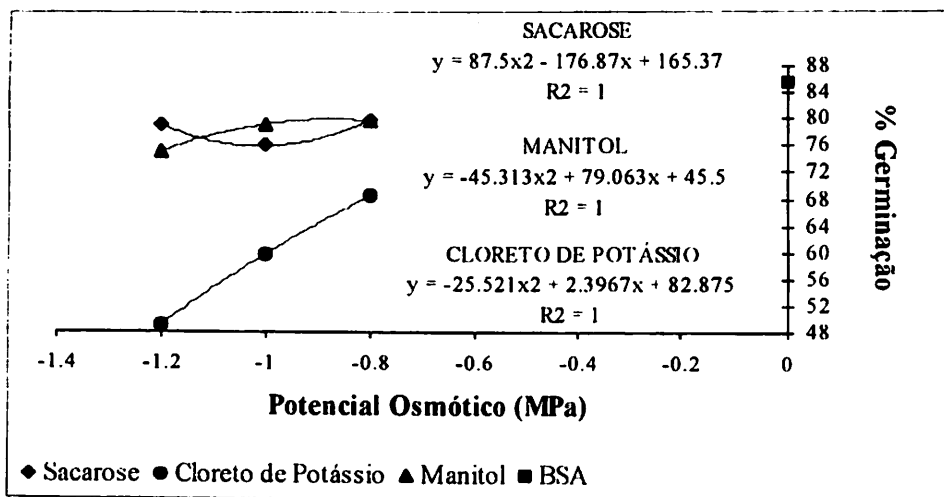


FIGURA 3: Análise de regressão relacionando porcentagem de germinação das sementes aos potenciais de restrição hídrica dos solutos (sacarose, cloreto de potássio e manitol) e à testemunha (BSA). UFLA, Lavras-MG, 2000.

4.2.2 Emergência de plântulas

As porcentagens de emergência de plântulas oriundas de sementes inoculadas com restrição por meio de sacarose, KCl e manitol (Tabela 3A) foram mais elevadas que as testemunhas (sementes inoculadas sobre BSA e sem inoculação), demonstrando efeito da utilização de solutos que promovem restrição hídrica. Neste experimento, a restrição hídrica proporcionou maior vigor às sementes, as quais produziram plântulas normais. Também a testemunha BSA foi superior à testemunha sem inoculação, pois a própria metodologia de inoculação realizada com BSA proporcionou aumento do vigor das sementes, resultando em aumento na emergência de plântulas. Diferenças foram também detectadas entre os solutos e tempos de inoculação utilizados e entre as interações soluto e tempo, soluto e potencial.

Na análise de regressão realizada para potenciais dos solutos (Figura 4), observou-se que aumentando a restrição hídrica através da sacarose e manitol, aumentou-se a emergência das plântulas. O contrário ocorreu com o soluto KCl, havendo redução da emergência com o aumento da restrição hídrica, provavelmente pela maior incidência de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* nas sementes inibindo a emergência. Com o aumento da restrição hídrica através da sacarose, o desenvolvimento do fungo diminuiu, devido à menor disponibilidade de água proporcionada pela sacarose.

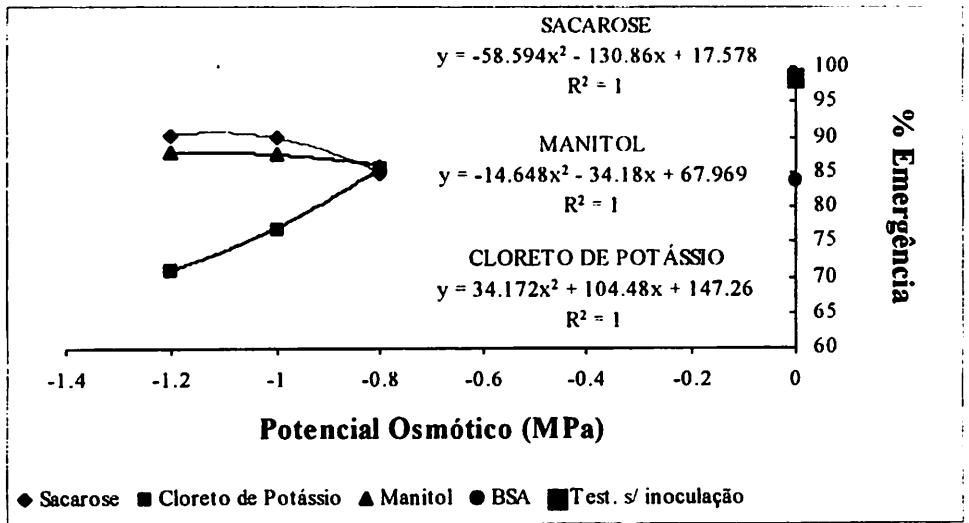


Figura 4: Regressão da % de emergência de plântulas relacionada aos potenciais de restrição hídrica (-0.8, -1.0 e -1.2 MPa) dos solutos. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Na análise de regressão realizada para comparar emergência de plântulas nos diferentes tempos de exposição das sementes ao fungo, nos três solutos, observou-se diminuição da emergência com o aumento do período de tempo. O mesmo ocorreu na análise para a testemunha BSA (Figura 5).

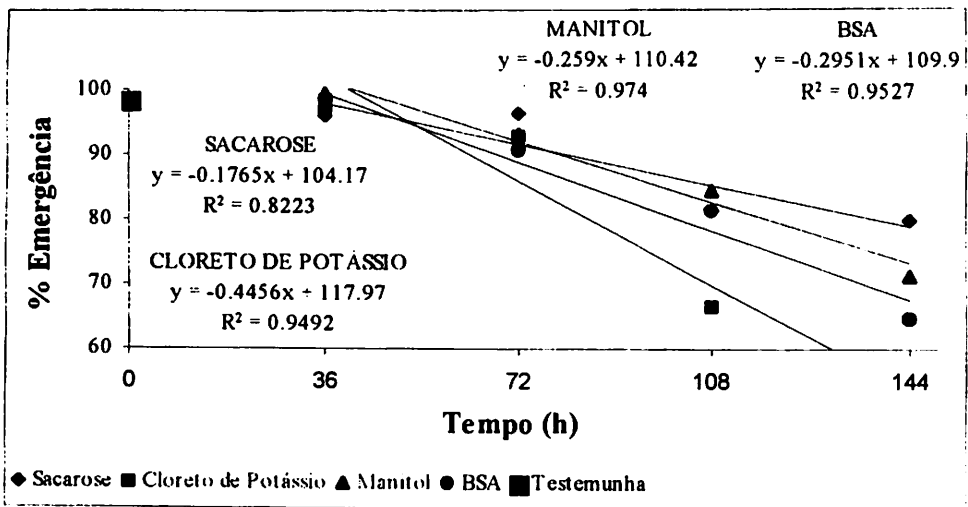


Figura 5: Análise de regressão para % de emergência de plântulas e tempo de permanência das sementes sobre o fungo. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Pelo teste de Scott-Knott para comparar os solutos utilizados dentro de cada potencial, observou-se que a emergência foi semelhante com a utilização dos solutos, sacarose, cloreto de potássio e manitol, em todos os solutos no potencial $-0,8\text{MPa}$. No potencial $-1,0$ e $-1,2\text{MPa}$ do meio BSA modificado com KCl, a maior incidência do fungo sobre as sementes proporcionou diminuição na emergência das plântulas (Tabela 2). Na interação soluto e tempo, a emergência foi semelhante nos solutos sacarose, cloreto de potássio e manitol, nos tempos 36 e 72h, mas a emergência diminuiu quando a inoculação foi realizada no meio BSA modificado com KCl nos tempos 108 e 144h (Tabela 2).

TABELA 2: Porcentagem média de emergência de plântulas na utilização dos solutos sacarose, kcl e manitol nos diferentes potenciais de restrição hídrica e tempos utilizados na inoculação das sementes de feijoeiro com *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli*. UFLA, Lavras-MG. 2000.

SOLUTO	POTENCIAIS DE RESTRIÇÃO HÍDRICA (MPa)				MÉDIA
	0.0	-0.8	-1.0	-1.2	
Sacarose	-	84.77 a	89.84 a	90.23 a	88.28
KCl	-	85.55 a	76.95 b	71.09 b	78.12
Manitol	-	85.94 a	87.50 a	87.89 a	87.11
Média					84.5*
BSA	83.33*	-	-	-	83.33
Testemunha	98.44*	-	-	-	98.44

SOLUTO	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (h)				MÉDIA
	36	72	108	144	
Sacarose	95.83 a	96.36 a	81.25 a	79.69 a	88.28
KCl	98.44 a	92.71 a	66.67 b	53.65 b	78.12
Manitol	99.48 a	93.23 a	84.37 a	71.35 a	87.11
BSA	96.87*	90.63*	81.25*	64.58*	83.33

Dados seguidos pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05\%$)

*Diferenças de emergência entre médias dos tratamentos e da testemunha (BSA) não foram significativas pelo teste F

* Diferenças de emergência entre médias dos tratamentos e da testemunha (sem inoculação) foram significativas pelo teste F ($P \leq 0,05\%$)

4.2.3 Índice de velocidade de emergência - IVE

O índice de velocidade de emergência foi inferior nos tratamentos com restrição hídrica quando comparado com BSA, mas foi superior quando comparado com testemunha sem inoculação. Ao comparar inoculações sobre BSA com testemunha sem inoculação, as sementes inoculadas sobre BSA tiveram maior índice de velocidade de emergência (Tabela 3A).

A análise de regressão (Figura 6) foi realizada para comparar diferentes tempos nos diferentes solutos e observou-se que à medida que aumentava o

tempo de permanência da semente sobre o fungo, diminuía o índice de velocidade de emergência das plântulas originadas de sementes inoculadas. Na testemunha BSA também observou-se o mesmo padrão, aumentando o tempo, diminuía a emergência. Os mesmos resultados foram observados em relação à emergência de plântulas, demonstrando que houve maior crescimento do fungo sobre a semente quando ela permanecia mais tempo sobre o fungo, comprometendo o seu desempenho das sementes.

Pela comparação de médias através do teste Scott-Knott, observou-se que houve diferenças entre os índices de velocidade de emergência das plântulas originadas de sementes inoculadas em meio BSA modificado com sacarose, cloreto de potássio e manitol, mas nos tempos 108 e 144h, o desempenho das sementes inoculadas sobre meio BSA modificado com sacarose e manitol foi superior (Tabela 3).

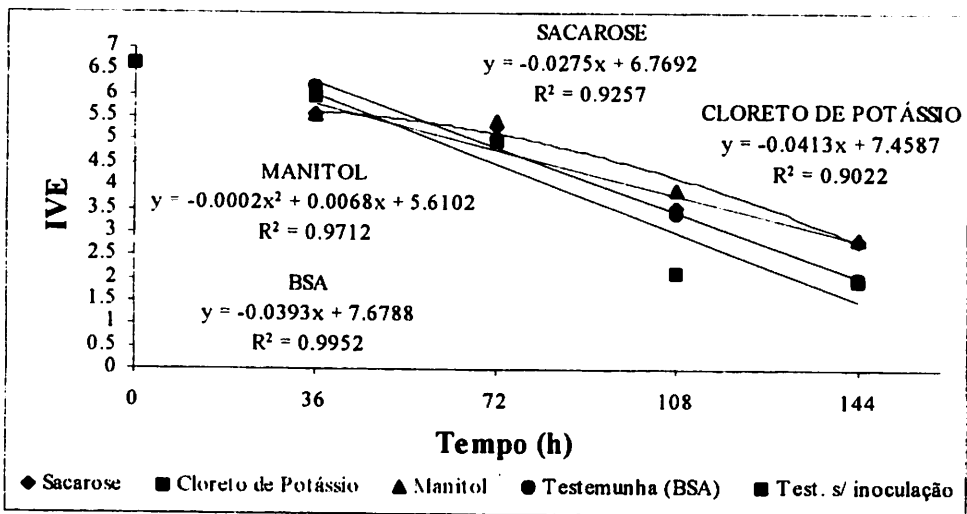


Figura 6: Análise de regressão do índice de velocidade de emergência de plântulas relacionando tempo em que as sementes permaneceram sobre o fungo (36, 72, 108 e 144h), aos solutos sacarose, KCl e manitol. UFLA, Lavras-MG, 2000.

TABELA 3: Média das porcentagens do índice de velocidade de emergência das plântulas nos tempos utilizados. UFLA, Lavras-MG, 2000.

SOLUTO	TEMPO (h)				MÉDIA
	36	72	108	144	
Sacarose	5.53 a	5.30 a	3.53 a	2.82 a	4.29
KCl	5.95 a	4.96 a	2.11 b	1.94 b	3.70
Manitol	5.53 a	5.39 a	3.94 a	2.84 a	4.42
					4.17*°
BSA	6.16	5.6	3.8	2.7	4.56*
Testemunha	-	-	-	-	6.63°

Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade

* Testemunha (BSA) superior ao tratamento pelo contraste de médias (teste T)

° Test. (s/ inoculação) superior ao tratamento pelo contraste de médias (teste T)

4.2.4 Incidência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro após inoculação

A incidência de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* foi superior nas sementes de feijoeiro inoculadas utilizando meio BSA modificado que em meio BSA. Dentre os solutos utilizados, observaram diferenças significativas, sendo que o KCl proporcionou maior crescimento do fungo nas sementes (Tabela 4). O mesmo não ocorreu entre os diferentes potenciais de restrição hídrica (Tabela 2A).

Com relação aos períodos de tempo utilizados na inoculação das sementes (Figura 7), as diferenças foram significativas ($P \leq 1\%$) entre os tratamentos, sendo maior a porcentagem de incidência do fungo nas sementes com aumento do tempo de exposição das mesmas ao fungo (Tabela 5B).

TABELA 4: Incidência (%) de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* (Fop) e de outros microrganismos em sementes de feijoeiro, após inoculação, nos diferentes solutos utilizados. UFLA, Lavras-MG, 2000.

SOLUTOS	Fop (%)	Outros (%)
BSA + Sacarose	49.04 b	12.63
BSA + KCl	64.17 a	10.88
BSA + Manitol	42.08 b	17.46
Média	51.76*	13.65**
BSA	38.8*	15.38**

Médias seguidas pelas mesmas letras, nas colunas, são estatisticamente iguais pelo teste Scott-Knott ($P \leq 0,05$)

* Tratamento superior à test. (BSA) pelo contraste de médias (teste de T)

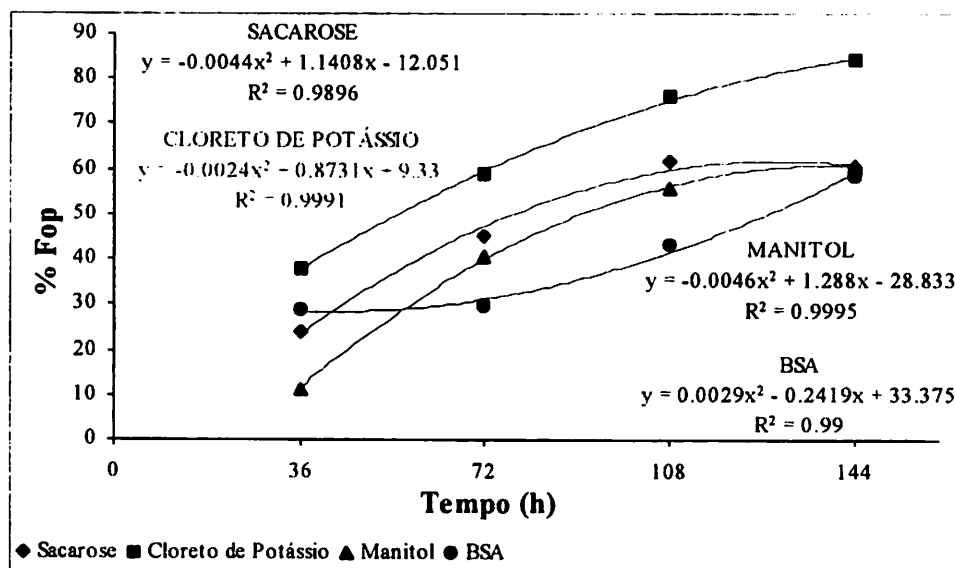


FIGURA 7: Regressão para % de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro nos diferentes produtos e tempos de inoculação. UFLA, Lavras-MG, 2000.

4.2.5 Ocorrência de outros microrganismos nas sementes de feijoeiro após inoculação de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli*

Outra variável utilizada nas avaliações foi a presença de outros microrganismos nas sementes, sendo agrupados os fungos e bactérias. A incidência destes microrganismos foi superior à medida que aumentava o tempo de exposição das sementes sobre os meios de restrição hídrica, revelando que, nestas circunstâncias, as condições foram mais favoráveis para o seu desenvolvimento (Tabela 2A).

4.3 Avaliação do desenvolvimento das plantas oriundas das sementes inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* sob restrição hídrica em ensaio conduzido em câmara de crescimento vegetal

4.3.1 Área Foliar

Os tratamentos com restrição hídrica (sacarose, KCl, manitol) possibilitam uma maior área foliar em comparação com a testemunha (BSA). Por sua vez, a área foliar das plantas oriundas de sementes inoculadas sobre meio BSA foi superior à testemunha sem inoculação (Tabela 3A), mostrando que, neste caso, a quantidade de inóculo presente na semente não influenciou na formação da área foliar das plantas.

A utilização de diferentes solutos, sacarose, cloreto de potássio e manitol, nos meios de cultura usados para inoculação de sementes, proporcionou resultados diferenciados de área foliar. Foi também significativa a variação entre os quatro tempos de permanência das sementes sobre o fungo e a interação soluto e tempo.

Na análise de regressão (Figura 8) realizada para comparar área foliar das plantas nos diferentes tempos de inoculação das sementes dentro de cada soluto de restrição hídrica, observou-se que à medida que aumentava o tempo de permanência das sementes sobre o meio de cultura, diminuía a área foliar das plantas originadas, ou seja, com maior tempo de exposição das sementes ao fungo, menor área foliar nas plantas originadas daquelas sementes: admite-se que sementes com maior grau de infecção pelo fungo devem apresentar um menor desenvolvimento.

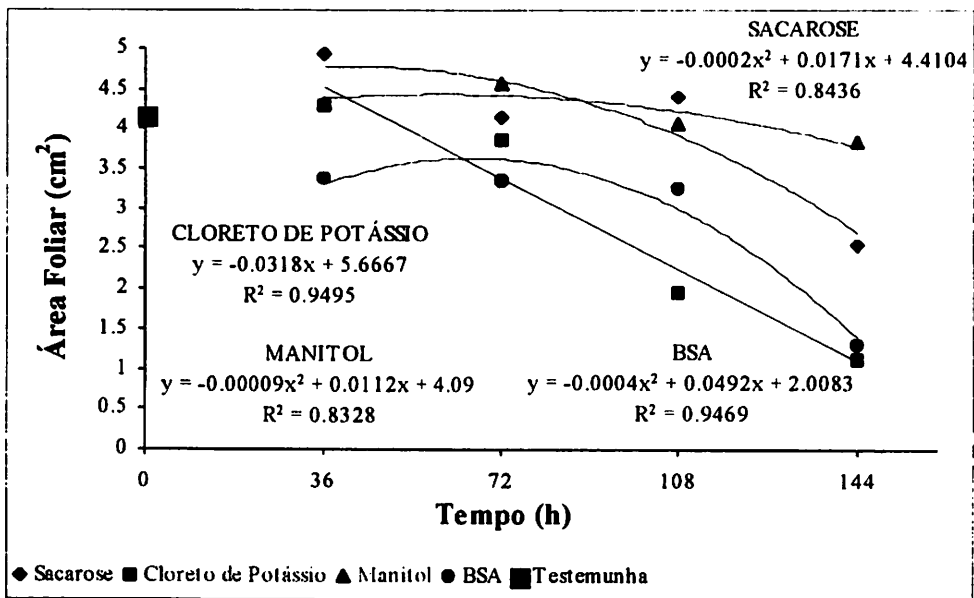


FIGURA 8: Análise de regressão da área foliar das plantas relacionando influência do tempo na inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* nas sementes sob restrição hídrica (tratamentos) e testemunha (BSA). UFLA, Lavras-MG, 2000.

Pelo teste Scott-Knott aplicado para área foliar de plantas originadas de sementes inoculadas sobre meio de cultura com diferentes solutos, dentro de cada tempo de exposição das sementes ao fungo, observou-se que não houve

diferença significativa na utilização dos três solutos nos tempos 36 e 72h. De forma contrária, no tempo 108h, a área foliar de plantas originadas de sementes inoculadas sobre o meio BSA modificado com o soluto KCl proporcionou menor área foliar. No tempo 144h, as áreas foliares das plantas foram distintas em relação aos três solutos, sendo que manitol proporcionou maior área foliar, seguido pela sacarose e KCl (Tabela 5).

TABELA 5: Porcentagem média da área foliar de plantas oriundas de sementes inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* sobre meio BSA modificado osmoticamente através de diferentes solutos por períodos de tempo variados. UFLA, Lavras-MG, 2000.

SOLUTO	TEMPO (h)				MÉDIAS
	36	72	108	144	
Sacarose	28.37 a	18.92 a	16.33 a	8.06 b	17.92
KCl	21.29 a	16.75 a	6.94 b	3.20 c	12.04
Manitol	23.8 a	24.94 a	19.9 a	20.89 a	22.38
					17.45*°
BSA	11.48	11.22	10.62	1.68	8.75*
Testemunha	16.4°	-	-	-	-

Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott ($P \leq 0,05\%$)

* Tratamentos superior à testemunha (BSA) pelo contraste de médias (teste T)

° Tratamentos superior à testemunha (s/ inoculação) pelo contraste de médias (teste T)

4.3.2 Altura de Plantas

A média da altura das plantas foi superior nos tratamentos com sacarose, KCl, manitol, quando comparado com a média das testemunhas (inoculação sobre BSA e sem inoculação).

Diferenças foram observadas na altura de plantas quando se analisaram separadamente os solutos e os tempos de permanência das sementes sobre o fungo. A interação soluto e tempo foi também significativa (Tabela 4A).

Na análise de regressão (Figura 9) realizada para comparar altura de plantas originadas de sementes inoculadas, em diferentes períodos de tempo, com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, observou-se uma diminuição na altura das plantas à medida que aumentava o tempo de exposição das sementes ao fungo, ocorrendo da mesma forma para todos os solutos utilizados.

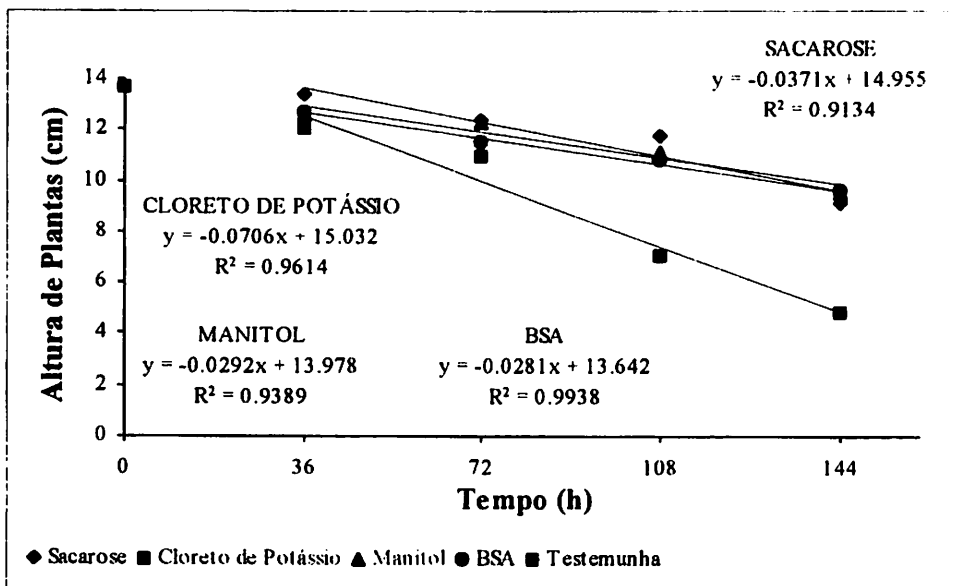


FIGURA 9: Análise de regressão relacionando altura de plantas e tempo de exposição das sementes ao *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* nos três solutos utilizados para restrição hídrica do meio de inoculação de sementes de feijoeiro. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Analisando a altura de plantas originadas de sementes inoculadas em meio modificado com diferentes solutos, através do teste de Scott-Knott, observou-se a mesma tendência das outras variáveis, não havendo diferença entre altura de plantas nos três solutos utilizados nos tempos 36 e 72h. Nos tempos 108 e 144h de permanência da sementes sobre o fungo em meio BSA

modificado com KCl, houve menor desenvolvimento das plantas, devido ao melhor desempenho do fungo sobre as sementes (Tabela 6).

TABELA 6: Porcentagem média de altura (cm) das plantas oriundas de sementes inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* sobre meio BSA modificado osmoticamente com diferentes solutos em cada tempo utilizado. UFLA, Lavras-MG, 2000.

SOLUTO	TEMPO (h)				MÉDIA
	36	72	108	144	
BSA + Sacarose	13.34 a	12.33 a	11.67 a	9.11 a	11.61
BSA +KCl	12.00 a	10.89 a	7.00 b	4.82 b	8.67
BSA +Manitol	12.61 a	12.25 a	11.05 a	9.51 a	11.35
					10.54*°
BSA	12.67	11.5	10.73	9.55	11.11*
Test. s/ inoculação	13.68°	-	-	-	

Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott ($P \leq 0,05\%$).

*Médias dos tratamentos e testemunha (BSA) não diferiram pelo teste F

°Médias dos tratamentos e testemunha (s/ inoculação) não diferiram pelo teste F

4.3.3 Peso de Planta e Raiz

O peso das plantas foi semelhante entre os tratamentos com restrição hídrica e a testemunha (BSA) com inoculação e superior em relação à testemunha sem inoculação. As sementes inoculadas originaram plantas com peso superior às não inoculadas devido, possivelmente, ao aumento do vigor proporcionado pelo condicionamento osmótico das sementes no momento da inoculação (Tabela 4A).

O peso das plantas foi variável entre os solutos em meio BSA modificado para inoculação de sementes com o fungo. A inoculação com KCl resultou em maior crescimento do fungo sobre as sementes, originando plantas com menores pesos (Tabela 7). O peso das plantas foi inversamente

proporcional ao tempo de exposição das sementes ao fungo ($P \leq 0,01$), sendo menores os pesos das plântulas originadas de sementes inoculadas por 108 e 144h (Figura 10).

Os resultados referentes a peso das raízes e peso de plantas tiveram uma mesma tendência em relação aos solutos. Observaram-se diferenças nos diversos solutos utilizados em meio BSA modificado, e nos tempos de permanência da sementes sobre o fungo. (Tabela 4A, Figura 11).

TABELA 7: Média dos pesos (g) de plantas e das raízes originadas de sementes inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* utilizando diferentes solutos. UFLA, Lavras-MG, 2000.

SOLUTO	PESO SECO (gramas)	
	PLANTA	RAIZ
BSA + Sacarose	0.68 a	0.12 a
BSA +KCl	0.58 b	0.10 b
BSA +Manitol	0.71 a	0.12 a
Média	0.66*	0.11**
BSA	0.53*	0.09*
Testemunha s/ inoculação	0.79°	0.13**

Teste Scott-Knott ($P \leq 0,05\%$)

Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas são estatisticamente iguais.

* Médias dos tratamentos e testemunha (BSA) não diferiram pelo teste F

° Tratamento superior à testem. (s/ inoculação) pelo contraste de médias (teste T)

**Médias dos tratamentos e testem. (s/ inoculação) não diferiram pelo teste F

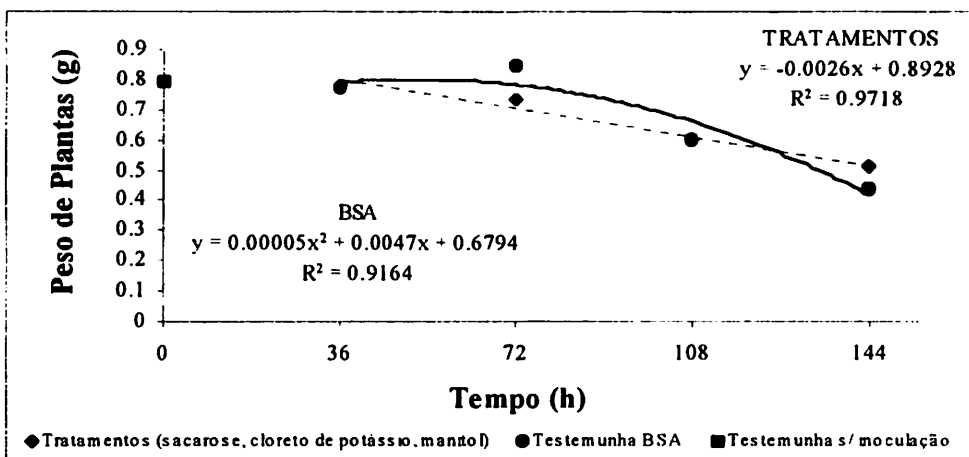


FIGURA 10: Análise de regressão para peso de planta de feijoeiro variando os tempos de inoculação de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes através dos tratamentos (sacarose, cloreto de potássio e manitol) e da testemunha (BSA). UFLA, Lavras-MG, 2000.

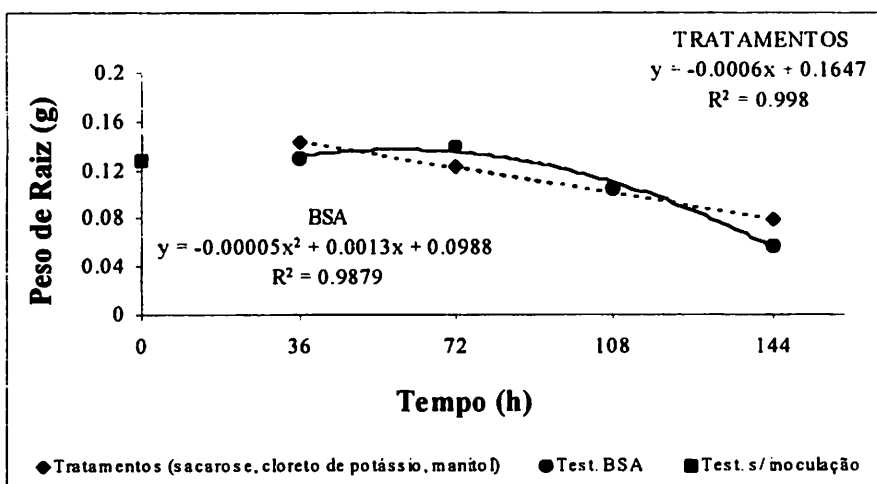


FIGURA 11: Análise de regressão para peso de raiz de feijoeiro variando os tempos utilizados na inoculação de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes através dos tratamentos (sacarose, cloreto de potássio e manitol) e da testemunha (BSA). UFLA, Lavras-MG, 2000.

4.4 Relação entre emergência de plântulas e incidência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* nas sementes de feijoeiro após inoculação

Baseado na Figura 12, foram observados valores diferenciados nas interseções entre as variáveis: incidência de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* nas sementes e emergência de plântulas em cada soluto utilizado.

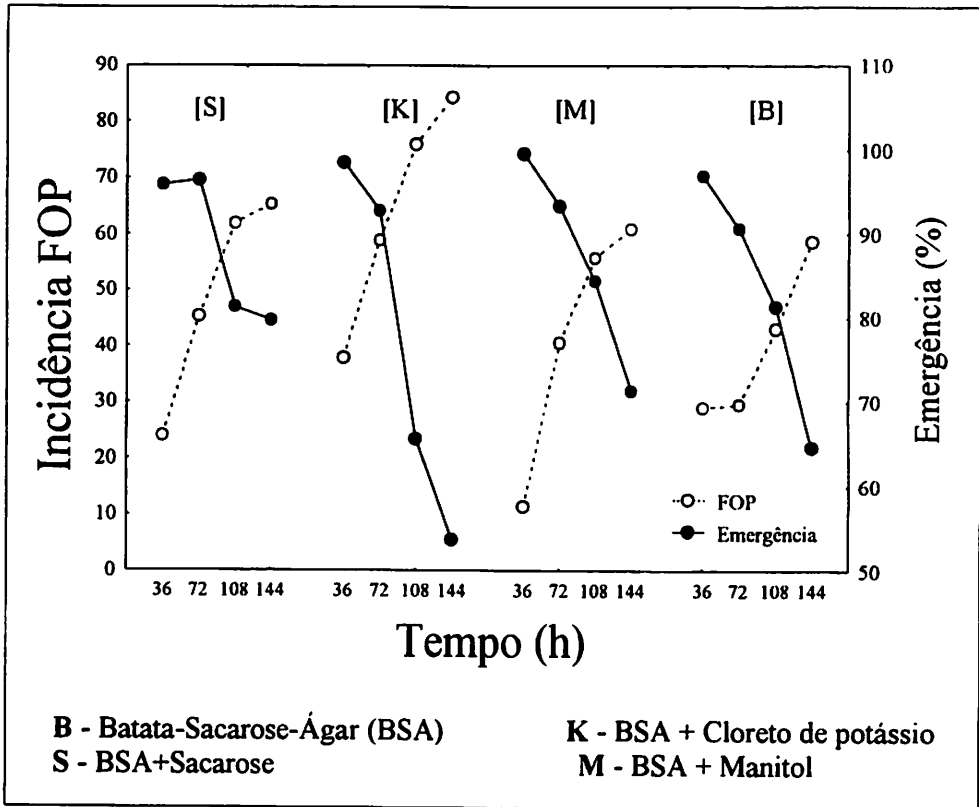


FIGURA 12: Interação entre incidência de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro e emergência de plântulas oriundas das sementes inoculadas com o mesmo fungo através dos tratamentos (sacarose, cloreto de potássio e manitol) e na testemunha (BSA). UFLA, Lavras-MG, 2000.

5 DISCUSSÃO

Os resultados de crescimento *in vitro* de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* obtidos concordam, de modo geral, com os resultados de trabalhos anteriores de Wearing & Burgess (1979); Manandhar & Bruehl, (1973), que relatam estímulo ao crescimento micelial de *Fusarium* em meio de cultura com potenciais hídricos mais negativos, até um valor limitante.

Neste estudo, observou-se que o crescimento do referido fungo foi estimulado até o potencial -0,92 MPa, abaixo do qual houve inibição.

Nos testes de germinação em rolo de papel, as sementes de feijoeiro inoculadas em substrato contendo KCl foram colonizadas intensamente por *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Nas avaliações das sementes que permaneceram por maiores períodos de tempo em contato com o fungo, a germinação foi ainda menor.

De acordo com Brownell & Schneider (1985), íons de potássio são facilmente acumulados pelas células microbianas, estimulando o seu desenvolvimento. Este fato parece Ter sido reproduzido no presente estudo.

A emergência de plântulas foi superior nos tratamentos em que realizou-se inoculação do fungo, sendo mantidas sobre substrato agarizado. Neste caso, as sementes absorvem água lentamente, passando pelo processo denominado osmocondicionamento. Este processo estimula os mecanismos condicionadores da germinação das sementes e favorece a emergência rápida de plântulas. Trigo *et al* (1999) obtiveram resultados semelhantes de emergência das plântulas oriundas de sementes osmocondicionadas com KNO_3 , em diferentes molaridades.

Por outro lado, o índice de velocidade de emergência não foi estimulado pelo método de inoculação utilizado. Certamente neste caso a atuação do patógeno foi responsável pelo baixo índice de vigor.


A incidência de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* nas sementes de feijoeiro após inoculação pelo método de restrição hídrica foi elevada, o que pode ser observado nos resultados de germinação e incidência do fungo. Utilizando a mesma metodologia, mas inoculando *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro, Carvalho (1999) obteve alta porcentagem do fungo nas sementes, com sintomas visíveis nas plântulas emergidas.

No meio de cultura contendo cloreto de potássio, houve maior crescimento do fungo sobre as sementes, a exemplo do que ocorreu no teste de germinação em rolo de papel. Brownell & Schneider (1985) relatam, em trabalhos anteriores, o estímulo do potássio ao crescimento de *Fusarium oxysporum*.

A área foliar e a altura de plantas foram influenciadas pela metodologia empregada neste estudo. Valores de área foliar para os tratamentos com restrição hídrica foram maiores até o período de 72 h de inoculação. Até este período, o crescimento do fungo sobre as sementes foi menor, não afetando o desempenho das plantas originadas destas sementes. Em períodos de inoculação mais longos o fungo afetou o desempenho das sementes, diminuindo a área foliar das plantas. Por sua vez a altura de plantas, comparada com as plantas originadas de sementes sem inoculação, diminuiu mesmo quando originadas de sementes que permaneceram por menores períodos de tempo sobre o fungo.

Os resultados referentes a peso de plantas e de raiz, separadamente, foram inferiores nos tratamentos em que as sementes foram inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, comparadas com a testemunha sem inoculação. De acordo com a literatura, a presença de patógenos nas sementes proporciona, em geral, a redução da massa de plantas (Machado, 1988; Menten, 1991).

Através dos resultados obtidos para relação entre emergência de plântulas e incidência de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, pode-se observar que à medida que se tem maior porcentagem de fungo nas sementes, há uma redução



da emergência de plântulas. Isto ocorreu de forma análoga em todos os substratos utilizados para inoculação das sementes, variando apenas o tempo de permanência das sementes de acordo com o substrato.

De modo geral a metodologia de inoculação de sementes por meio da restrição hídrica parece ter uma aplicação mais extensiva em relação a outras interações, patógeno e semente, conforme foi o caso demonstrado por Carvalho (1999) para a interação *Colletotrichum lindemuthianum* e sementes de feijoeiro.

6 CONCLUSÕES

1. A inoculação das sementes de feijoeiro por meio da técnica de restrição hídrica, possibilita obtenção de sementes portadoras de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em níveis diferenciados de infecção.
2. A adição, em separado, de sacarose, cloreto de potássio e manitol ao meio BSA foi capaz de inibir a germinação das sementes de feijoeiro durante o período de inoculação com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* até um limite de 144h nos diferentes potenciais. Desta forma, entende-se que o menor valor de potencial hídrico, -0.8 MPa, seja o mais adequado, pelo uso de menores quantidades de solutos.
3. Dentre os solutos utilizados para modificar osmoticamente o substrato de inoculação das sementes, cloreto de potássio proporcionou a maior incidência de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e a maior redução na taxa de germinação das sementes.
4. A ocorrência de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro inoculadas em substrato com diferentes potenciais hídricos é variável em função do soluto e período de exposição das sementes ao fungo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAWI, G.S.; PASTOR-CORRALES, M.A. **Root rots of bean in latin american and África: diagnosis, research methodologies, and management strategies.** Cali: CIAT, 1990. 114p.
- ADEBAYO, A.A.; HARRIS, R.F. Fungal growth responses to osmotic as compared to matric water potential. **Soil Science Society of America Proceedings, Madison, v.85, n.3, p.465-469, May/June 1971.**
- AGARVAL, V.K.; SINCLAIR, J.B. **Principles of seed pathology.** Boca Raton, Flórida, 1987. v.1, 175p.
- ALAM, S.; JOYCE, D.; WEARING, A. Effects of equilibrium relative humidity on *in vitro* growth of *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata*. **Australian Journal of Experimental Agriculture, East Melbourne, v.36, n.3, p.383-388, 1996.**
- AMARAL, E.M. Sanidade de sementes de feijão. **Summa Phytopathologica, Campinas, v.7, n.3/4, p.13-14, jul./dez. 1981.**
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIN, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle.** São Paulo: Agronômica Ceres, 1996. 289 p.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination.** New York: Springer-Verlag, 1983. v.1, 306p.

- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seed physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1985. 367p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília: LANARV/SNAD/MA, 1992. 360p.
- BROWNELL, K.H.; SCHNEIDER, R.W. Roles of matrix and osmotic components of water potential and their interaction with in the growth for *Fusarium oxysporum* in synthetic media and soil. **Phytopathology**, St. Paul, v.75, n.1, p. 53-57, Jan. 1985.
- CARDOSO, C.O.N.; KIMATI, N.H.; FERNANDES, N.G. Nota sobre a ocorrência de *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *phaseoli* Kendrick e Snyder causando murcha em feijoeiro. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, v.23, p. 273-276, 1966.
- CARVALHO, H. P. **Aspectos patológicos e fisiológicos de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizadas na região sul do estado de Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 1989. 97p. (Dissertação – Mestrado em Fitossanidade/Fitopatologia).
- CARVALHO, J.C.B. de. **Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Lavras: UFLA, 1999. 98p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia/Fitotecnia).
- CARVALHO, N.M.; NAGAKAWA, J. **Sementes: Ciência, tecnologia e produção**. 3.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1988. 424p.

- CHANDLER, D.; HEALE, J.B.; GILLESPIE, A.T. Effect of osmotic potential on the germination of conidia and colony growth of *Verticillium lecanii*. **Mycological Research**, Cambridge, v.98, n.4, p.384-388, 1994.
- CHAVES, K.C.; RAVA, C.A.; COSTA, J.L.S. Inoculação de sementes e controle químico da sarna do feijoeiro comum (*Colletotrichum* sp.). In: REUNIAO NACIONAL DE FEIJAO, 6., 1999, Salvador, BA. **Resumos expandidos...** Salvador, BA: EMBRAPA, 1999. p.223-225.
- COOK, R.J.; DUNIWAY, J.M. Water relations in the life-cycles of soilborne plant pathogens. In: PARR, J.F.; GARDNER, W.R. ELLIOT, L.F. (eds). **Water potential relations in soil microbiology**. Madison: Soil Science Society of America, 1981. p.119-139. (Soil Science Society of America Special Publication, 9).
- COOK, R. J.; PAPENDICK, R.I. Influence of water of soils and plants on root disease. **Annual Review of Plant Pathology**, Palo Alto, v.10, p.349-374. 1972.
- COOK, R. J.; PAPENDICK, R.I. Role of water potential in microbial growth and development of plant disease, with special reference to postharvest pathology. **HortScience**, Madison, v.13, n.5, p. 559-564, Oct. 1978.
- COOK, R.J.; PAPENDICK, R.I.; GRIFFIN, D.M. Growth of two root-rot fungi by osmotic and matric water potentials. **Soil Science Society of America Proceedings**, Madson, v.36, n.1, p.78-82, Jan./Feb. 1972.

- FU, J. R.; JI, D.Y.; ZHANG, B.Z. Preliminary report on the promotive effects of osmoconditioning on the germination of several crop seeds. **Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni**, n.2, p.139-40, 1983. In: SEED ABSTRACTS, Wallingford, v.6, n.11, p.355, Nov. 1983. (Resumo).
- HELSEL, D.G.; HELSEL, Z.R.; MINOR, H.C. Field studies on osmoconditioning soybeans. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.14, n.3, p.291-297, 1986. In: SEED ABSTRACTS, Wallingford, v.10, n.2, p.51, Feb. 1987. (Resumo).
- HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; GULLIVER, R.L. Accelerated germination by osmotic seed treatment. **Nature**, London, v.246, n.5427, p.42-44, Nov. 1973.
- HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; TURNER, Y. J. Invigoration of seeds? **Seed Science & Technology**, Zurich, v.3, n.3/4, p.881-888, 1975.
- IAMAUTI, M.T. **Avaliação de danos causados por *Uromyces appendiculatus* no feijoeiro**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 1995. (Tese – Doutorado).
- IOANNOU, N.; SCHNEIDER, R.G.; GROGAN, R.G.; DUNIWAY, J.M. Effect of water potential on growth, sporulation and production of microsclerotia by *Verticillium dahliae*. **Phytopathology**, St. Paul, v.67, n.5, p.637-644, May 1977.

- KENDRICH, J.B.; SNYDER, W.C. *Fusarium* yellows of beans. **Phytopathology**, St. Paul, v.32, p.1010-1014, 1942.
- KHAN, A.A.; BRAUN, J.W. ; TAO, K.L.; MILLIER, W.F.; BENSIN, R.F. New methods for maintaining seed vigor and improving performance. **Journal of Seed Technology**, Lansing, v.1, n.2, p.33-57, 1976.
- KHAN, A.A.; PECK, N.H.; SAMIMY, C. Seed osmoconditioning, physiological and biochemical changes. **Israel Journal of Botany**, Jerusalém, v.29, n.1/4, p.133-144, 1980/1981.
- KNYPL, J.S.; KHAN, A.A. Osmoconditioning of soybean seeds to improve performance at suboptimal temperatures. **Agronomy Journal**, Madison, v.73, n.1, p.112-116, Jan./Feb. 1981.
- KRAFT, J.M.; BURKE, D.W.; HAGLUND, W.A. *Fusarium* diseases of beans, peas, and lentils. In: NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; COOK, R.J. *Fusarium: disease, biology, and taxonomy*. University Park: Pennsylvania State University, 1981. p.142-156.
- LASCA, C. C. Estudos sobre a flora fúngica de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **O Biológico**, São Paulo, v.44, n.6, p.125-134, jun. 1978.
- LEAL, E.C.; BOLKAN, H.A. Ocorrência de *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* e *Pythium* spp. em sementes de feijão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.6, n.3, p.580, Out. 1981. (Resumo, 111).

- LEUKEL, R.W. Factors influencing infection of barley by loose smut, **Phytopathology**, St. Paul, v.26, p.630, 1936.
- MACHADO, J. da C. **Apostilas das aulas de patologia de sementes**. Lavras: UFLA, 1999.
- MACHADO, J. da C. **Patologia de sementes - fundamentos e aplicações**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1988. 106p.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.2, p.176-177, Mar./Apr. 1962.
- MANANDHAR, J.B.; BRUEHL, G.W. *In vitro* interactions of *Fusarium* and *Verticillium* wilt fungi with water, pH and temperature. **Phytopathology**, St. Paul, v.63, p.413-419, 1973.
- MENEZES, J.R. Teste de Sanidade em sementes de Feijão **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.395-405.
- MENEZES, J.R.; MOHAN, S.K.; BIANCHINI, A.; SOUZA, G.L. Qualidade sanitária de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.6, n.3, p.497-507, out. 1981.
- MENEZES, J.R.; MOHAN, S.K.; ROSSETTO, E.A.; BIANCHINI, A. Qualidade sanitária de sementes de feijão na região norte do estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.3, n.1, p.122-123, fev. 1978. (Resumo, 104).

- MENG, X.D.; LI, S.X. Improvement of vegetable soybean seed vigour by controlled water absorption pretreatments. **Acta Agricultural Universitatis Zhejangensis**, Shandongs, v.18, n.1, p.51-55, 1992. In: **SEED ABSTRACTS**, Wallingford, v.16, n.7, p.285, July 1993. (Resumo).
- MENTEN, J.O.M., Prejuízos causados por patógenos associados às sementes. p.115-136. In: MENTEN, J.O.M. **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. São Paulo: Esalq/USP, 1991. 321p.
- MENTEN, J.O.M., BUENO, J.T. Transmissão de patógenos pelas sementes. In: **Patologia de Sementes**. SOAVE, J.; WETZEL, M.M. (eds). Fundação Cargill, Campinas, SP. p.164-191. 1987.
- MESTERHAZY, A. Comparative analysis of artificial inoculation methods with *Fusarium* spp. on winter wheat varieties, **Phytopathologische Zeitschrift**. Berlin, v.93, p.12, 1978.
- MICHEL, B.E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potencial to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v.87, n.1, Jan./Fev. 1995.
- NIREMBERG, H.I. A simplified method for identifyng *Fusarium* spp. occurring on wheat, **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.59, n.9, p.1599-1609, Sept. 1981.
- NUNES JR., J.; MENTEN, J.O.M. Levantamento de fungos associados às sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) no estado de Santa Catarina. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v.11, n.1/2, p.12-13, jan./jun. 1985.

OLIVEIRA, J.A. Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum anuum* L.). Lavras: ESAL, 1991. 111p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia - Fitossanidade).

PANDEY, D.K. Priming induced alleviation of the effects of natural ageing derived selective leakage of constituents in French beans seeds. *Seed Science and Technology*, Wageningen, v.17, p.391-397, 1989.

PANDEY, D.K. Priming induced repair in French bean seeds, *Seed Science and Technology*, Wageningen, v.16, p.527-532, 1988.

PEREIRA, G.V.; YOKOYAMA, L.P. Produção e uso de sementes de feijão no Estado de Goiás, p.580-583. In: REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 6., 1999, Salvador, BA. Resumos expandidos... Salvador, 1999. 880p.

PUHALLA, J.E.; BELL, A.A. Genetics and Biochemistry of Wilt Pathogens. In: MACE, M.E.; BELL, A.A.; BECKMAN, C.H. (eds) *Fungal Wilt Diseases of Plants*. New York: Academic Press, 1981. Cap.6, p.145-192.

RAVA, A.C.; SARTORATO, A.; COSTA J.G.C. Reação de genótipos de feijoeiro comum ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em casa de vegetação. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.21, n.2, p.296-300, jun. 1996.

RIBEIRO DO VALE, F.X.; ZAMBOLIM, L. Feijão comum: podridão, tombamento e murcha causados por fungos do solo. In: UNIVERSIDADE

- FEDERAL DE VIÇOSA, **Controle de doenças de plantas**. Viçosa: UFV/ Ministério de Agricultura e Abastecimento, 1997. p.375-402.
- SANTOS, G.R.; COSTA, H.; PELUZIO, J.M.; MIRANDA, G.V. Transporte, transmissibilidade e patogenicidade da micoflora associada às sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Ceres**, Viçosa, v.43, n.249, p.621-627, set./out. 1996.
- TRIGO, M.F.O.O.; NEDEL, J.L.; GARCIA, A.; TRIGO, L.F.N. Efeitos do condicionamento osmótico com soluções aeradas de nitrato de potássio no desempenho de sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.21, n.1, p.139-144, 1999.
- TUSET BARRACHINA, J.J. Estudios sobre la marchitez y secado de plantas herbáceas. I. *Fusarium* patógeno de la judia em lavante. **Anais do Instituto Nacional de Investigacoes Agrarias Protecao Vegetal**, v.3, p.793, 1973.
- WEARING, A.H.; BURGESS, L.W. Water potential and the saprophytic growth of *Fusarium roseum* 'Graminearum'. **Soil Biology and Biochemistry**. Oxford, v.11, n.6, p.661-667, 1979.
- WINTER, W.E.; MATHUR, S.B.; NEERGAARD, P. Seedborne organisms of Argentina: a survey. **Plant Disease Reporter**, Saint Paul, v.58, n.6, p.507-511, June 1974.
- WOODSTOCK, L.W.; TAO, K.L.J. Prevention of imbibitional injury in low vigor soybean embryonic axes by osmotic control of water uptake. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.51, n.1, p.133-139, Jan. 1981.

ANEXOS

ANEXO A	Página
TABELA 1A Resumo da análise de variância dos dados referentes ao índice de crescimento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> , desenvolvidos em meio agarizado controlado osmoticamente com sacarose, kcl e manitol nos potenciais hídricos 0.0, -0.8, -1.0 e-1.2 MPa.....	56
TABELA 2A Resumo da análise de variância dos dados referentes à germinação das sementes, incidência de <i>Fusarium</i> e incidência de outros microrganismos nas sementes após inoculação com <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> , em meio agarizado controlado osmoticamente com sacarose, kcl e manitol nos potenciais hídricos 0.0, -0.8, -1.0 e-1.2 MPa.....	57
TABELA 3A Resumo da análise de variância dos dados referentes à emergência, índice de velocidade de emergência e área foliar de plântulas originadas de sementes inoculadas com <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> , em meio agarizado controlado osmoticamente com sacarose, kcl e manitol nos potenciais hídricos 0.0, -0.8, -1.0 e-1.2 MPa.....	58
TABELA 4A Resumo da análise de variância dos dados referentes à Altura de Plantas, Peso de plantas e Peso de Raízes, oriundas de sementes inoculadas com <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> em meio agarizado controlado osmoticamente com sacarose, kcl e manitol nos potenciais hídricos 0.0, -0.8, -1.0 e-1.2 MPa.....	59

TABELA 1A: Resumo da análise de variância dos dados referentes ao índice de crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, desenvolvidos em meio agarizado controlado osmoticamente com sacarose, kcl e manitol nos potenciais hídricos 0.0, -0.8, -1.0 e -1.2 MPa

Fator de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Soluto	2	0.012681 ns
Potencial	3	0.486831 **
Soluto x Potencial	6	0.003395 ns
Erro	36	0.005069
CV (%)		2.09

** Teste de F significativo a 1% de probabilidade

ns = Teste de F não significativo a 5% de probabilidade

TABELA 2A: Resumo da análise de variância dos dados referentes à germinação, incidência de *Fusarium* e de outros microorganismos nas sementes de feijoeiro após inoculação com *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em meio BSA modificado com sacarose, kcl e manitol nos potenciais hídricos -0.8, -1.0 e -1.2 MPa. UFLA, LAVRAS-MG, 2000.

FATOR DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO		
		GERMINAÇÃO	FUSARIUM	OUTROS°
Blocos	3	1.281,5181	13.736,5122	2.6419
Tratamentos	(39)	2.194,9022	1.757,6240	0.0511
Soluto	2	5.742,6943 **	6.118,8611 **	0.0659 ns
Potencial	2	811,4318 **	495,4444 ns	0.0409 ns
Tempo	3	20.101,0137 **	15.092,5463 **	0.2944 **
Soluto x Potencial	4	425,2299 *	335,7778 ns	0.0080 ns
Soluto x Tempo	6	725,3416 **	69,4907 ns	0.0111 ns
Potencial x Tempo	6	128,9160 ns	201,1852 ns	0.0336 ns
Soluto x Potencial x Tempo	12	88,3194 ns	250,6296 ns	0.0454 ns
Adicional	3	776,2222 **	661,5778 ns	0.0165 ns
Fatorial x Adicional	1	1432,1797 **°	2.509,2137 **†	0.0019 ns
Erro***		163,3254	341,7856	0.0576
CV		17.51	36.58	87.41

* Teste de F significativo a 5% de probabilidade ** a 1% de probabilidade ns = Teste de F não significativo

*** Os graus de liberdade do erro para germinação, incidência de *Fusarium* o outros microorganismos é, respectivamente, 112,117 e 117.

°Dados de outros microorganismo transformados para $\text{arc sen } \sqrt{x/100}$

° Valores do tratamento adicional (testemunha BSA) superior ao fatorial (tratamentos) pelo teste de T.

† Valores do fatorial (tratamentos) superior ao tratamento adicional (testemunha BSA) pelo teste de T.

TABELA 3A: Resumo da análise de variância dos dados referentes à emergência de plântulas oriundas de sementes inoculadas com *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em meio BSA modificado com sacarose, kcl e manitol nos potenciais hídricos -0.8, -1.0 e -1.2 MPa. UFLA, LAVRAS-MG, 2000.

FATOR DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO		
		EMERGÊNCIA	IVE	ÁREA FOLIAR
Blocos	3	3.207,8318	20.2959	79.4696
Tratamentos	(40)	888,0798	8.9485	6.0459
Soluto	2	1.507,5466 **	6.1854 **	27.1460 **
Potencial	2	69,5229 ns	0.3168 ns	0.4324 ns
Tempo	3	7.000,5286 **	82.8836 **	28.8642 **
Soluto x Potencial	4	455,8713 *	0.7150 ns	1.2459 ns
Soluto x Tempo	6	566,4597 **	2.8849 *	6.2577 *
Potencial x Tempo	6	78,8748 ns	0.4891 ns	2.2831 ns
Soluto x Potencial x Tempo	12	231,8157 ns	1.4718 ns	1.2005 ns
Fatorial x Adicional	1	234.1741 ns	5.05865 °	5.0459 ns
Fatorial x Testemunha	1	813.8788 *††	9.5169 **††	24.2096 **††
Demais (adicional + test.)	(4)	644,7706	13.1724	4.2017
Adicional	3	636,8523 **	11.3549 **	3.4947 ns
Adicional x Testemunha	1	1.082,9076 **‡	14.9406 **‡	9.9281 *‡
Erro		115	115	120
CV		14.72	24.15	41.45

* Teste de F significativo a 5% de probabilidade ** a 1% de probabilidade ns = Teste de F não significativo

*** Os graus de liberdade do erro para emergência, IVE e área foliar são, respectivamente, 115, 115 e 120.

† Valores do fatorial (tratamentos) superior ao tratamento adicional (testemunha BSA) pelo teste de T.

‡ Valores do tratamento adicional (testemunha BSA) superior à testemunha sem inoculação pelo teste de T.

†† Valores do fatorial (tratamentos) superior à testemunha sem inoculação pelo teste de T.

° Valores do tratamento adicional (testemunha BSA) superior ao fatorial (tratamentos) pelo teste de T.

TABELA 4A: Resumo da análise de variância dos dados referentes Altura de Plantas, Peso de Plantas e Peso de Raízes oriundas de sementes inoculadas com *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em meio BSA modificado com sacarose, kcl e manitol nos potenciais hídricos -0.8, -1.0 e -1.2 MPa. UFLA, LAVRAS-MG, 2000.

FATOR DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO		
		ALTURA DE PLANTAS	PESO DE PLANTAS	PESO DE RAIZ
Blocos	3	158.3907	0.3973	0.0648
Tratamentos	(40)	24.0033	0.8265	0.0036
Soluto	2	122.3187 **	0.2213 **	0.0066 **
Potencial	2	2.3991 ns	0.0439 ns	0.0023 ns
Tempo	3	166.9175 **	0.5582 **	0.0264 **
Soluto x Potencial	4	1.4136 ns	0.0297 ns	0.0016 ns
Soluto x Tempo	6	14.4571 *	0.0434 ns	0.0011 ns
Potencial x Tempo	6	3.6231 ns	0.0170 ns	0.0002 ns
Soluto x Potencial x Tempo	12	5.9095 ns	0.0212 ns	0.0015 ns
Fatorial x Adicional	1	13.1870 ns	0.0631 ns	0.0020 ns
Fatorial x Testemunha	1	4.2665 ns	0.1165 *††	0.0044 ns
Demais	(4)	9.2381	0.0860	0.0034
Adicional	3	5.9273 ns	0.0937 **	0.0040 *
Adicional x Testemunha	1	13.5809 ns	0.1839 **‡	0.0066 *‡
Erro		6.1449	0.0219	0.0011
CV		23.12	22.44	30.09

* Teste de F significativo a 5% de probabilidade

** Teste de F significativo a 1% de probabilidade

ns = Teste de F não significativo a 5% de probabilidade

*** O grau de liberdade do erro para altura de plantas, peso de plantas e peso de raiz é 115, para todos os parâmetros.

†† Valores do fatorial (tratamentos) superior à testemunha sem inoculação pelo teste de T.

‡ Valores do tratamento adicional (testemunha BSA) superior à testemunha sem inoculação pelo teste de T.

ANEXO B**Página**

TABELA 1B	Dados referentes ao teste de germinação das sementes a serem inoculadas com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	61
TABELA 2B	Dados referentes ao teste de tetrazólio, como indicação de vigor, das sementes a serem inoculadas com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	61
TABELA 3B	Dados referentes ao perfil sanitário das sementes a serem inoculadas com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> pelo método 'blotter-test'.....	61
TABELA 4B	Quantidade dos solutos adicionados ao meio agarizado BSA visando controle do potencial hídrico.....	62
TABELA 5B	Médias das porcentagens de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> e outros microrganismos em sementes de feijoeiro, após inoculação, nos quatro tempos utilizados.....	62
TABELA 6B	Cálculo das derivadas das equações de regressão.....	63

TABELA 1B: Dados referentes ao teste de germinação das sementes a serem inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

Repetição	Sementes		
	Normais	Anormais	Mortas
1	50	-	-
2	49	-	1
3	49	-	1
4	49	1	-

TABELA 2B: Dados referentes ao teste de tetrazólio, como indicação de vigor, das sementes a serem inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

	NOTAS		
	1 a 3	4 e 5	6 a 8
Porcentagem	96 %	4 %	-
Nº de sementes	192	8	-

TABELA 3B: Dados referentes ao perfil sanitário das sementes a serem inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* pelo método 'blotter-test'.

	Repetições**								Total*
	1	2	3	4	5	6	7	8	
<i>Cladosporium</i> sp.	20	15	22	19	22	22	22	21	81.5
<i>F. semitectum</i>	-	1	-	2	-	1	2	-	3.0
<i>F. moniliforme</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	0.5
<i>Aspergillus niger</i>	-	2	2	-	1	2	2	-	4.5
<i>Penicillium</i> sp.	-	1	-	2	3	8	4	-	9.0
<i>Rhizopus</i> sp.	-	8	-	-	-	-	-	-	4.0

**Valores das repetições em número de sementes

*Valor total em porcentagem

TABELA 4B: Quantidade dos solutos adicionados ao meio agarizado BSA visando controle do potencial hídrico

SOLUTOS (g)	POTENCIAIS DE RESTRIÇÃO HÍDRICA (MPa)					
	-0.8		-1.0		-1.2	
	soluto	solução*	soluto	solução*	soluto	solução*
Sacarose	100.9	934.8	123.5	920.8	145.1	907.4
KCl	13.1	992.3	16.4	991.0	19.7	989.8
Manitol	56.6	960.0	70.1	951.1	83.4	942.4

* solução composta de decocto de batata

TABELA 5B: Médias das porcentagens de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* e outros microrganismos em sementes de feijoeiro, após inoculação, nos quatro tempos utilizados.

TEMPO (h)	Tratamento		BSA	
	FOP (%)	OUTROS (%)	FOP (%)	OUTROS (%)
36	24.39	6.78	29.0	10.0
72	48.17	8.22	29.5	12.0
108	64.44	21.0	43.0	22.5
144	70.06	19.0	58.67	17.0
Média	51.76	13.65	38.8	15.38

TABELA 6B: Cálculo das derivadas das equações de regressão

	Equação de Regressão	Cálculo
Crescim.micelial	$y = -0.4964x^2 + 0.9111x + 3.0976$	$x = -0.92 \text{ MPa}$
% Germinação		
BSA + Sacarose	$y = 87.5x^2 - 176.87x + 165.37$	$x = -1.01 \text{ MPa}$
BSA + KCl	$y = -25.521x^2 + 2.3967x + 82.875$	$x = -0.046 \text{ MPa}$
BSA + Manitol	$y = -45.313x^2 + 79.063x + 45.5$	$x = -0.87 \text{ MPa}$
% Fusarium		
BSA	$y = 0.0029x^2 - 0.2419x + 33.375$	$x = 41.71 \text{ h}$
BSA + Sacarose	$y = -0.0044x^2 + 1.1408x - 12.051$	$x = 129.64 \text{ h}$
BSA + KCl	$y = -0.0024x^2 + 0.8731x + 9.333$	$x = 181.89 \text{ h}$
BSA + Manitol	$y = -0.0046x^2 + 1.288x - 28.033$	$x = 280 \text{ h}$
% Emergência		
BSA + Sacarose	$y = -58.594x^2 + 130.86x + 17.578$	$x = -1.12 \text{ MPa}$
BSA + KCl	$y = -34.172x^2 + 104.48x + 147.26$	$x = -1.53 \text{ MPa}$
BSA + Manitol	$y = -14.648x^2 + 34.18x + 67.969$	$x = -1.17 \text{ MPa}$
IVE		
BSA + Manitol	$y = -0.0002x^2 + 0.0068x + 5.6102$	$x = 15.5 \text{ h}$
Área Foliar		
BSA	$y = 0.0004x^2 + 0.0492x + 2.008$	$x = 64.5 \text{ h}$
BSA + Sacarose	$y = 0.0002x^2 + 0.0171x + 4.41$	$x = 42.75 \text{ h}$
BSA + Manitol	$y = 0.00009x^2 + 0.0112x + 4.0958$	$x = 62.22 \text{ h}$
Peso de Planta		
BSA	$y = 0.00005x^2 + 0.0047x + 0.679$	$x = 47.0 \text{ h}$
Peso de Raiz		
BSA	$y = 0.00005x^2 + 0.0013x + 0.0988$	$x = 13 \text{ h}$

ANEXO C

Meio BSA

Água de 200g de batata.....	500 mL
Sacarose.....	20 g
Ágar.....	20 g
Água destilada.....	500 mL

Meio SNA

KH_2PO_4	1.0 g
KNO_3	1.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
KCl.....	0.5 g
Glicose.....	0.2 g
Sacarose.....	0.2 g
Ágar.....	20 g
Água destilada.....	1000 mL

TABELA 1D	Teste de Dunnett ($P < 0.05$) para contraste entre médias dos tratamentos (sementes de feijoeiro inoculadas com <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> em meio BSA com restrição hídrica) com a testemunha, inoculação em BSA sem restrição hídrica, nas avaliações de germinação, <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> e outros microrganismos.....	66
TABELA 2D	Teste de Dunnett ($P < 0.05$) para contraste entre médias dos tratamentos (sementes de feijoeiro inoculadas com <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> em meio BSA com restrição hídrica) com a testemunha, inoculação sem restrição hídrica, nas avaliações de emergência e índice de velocidade de emergência – IVE.....	67
TABELA 3D	Teste de Dunnett ($P < 0.05$) para contraste entre médias dos tratamentos (sementes de feijoeiro inoculadas com <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> em meio BSA com e sem restrição hídrica) com a testemunha sem inoculação nas avaliações de emergência e índice de velocidade de emergência – IVE.....	68
TABELA 4D	Teste de Dunnett ($P < 0.05$) para contraste entre médias dos tratamentos (sementes de feijoeiro inoculadas com <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> em meio BSA com restrição hídrica) com a testemunha (inoculação sem restrição hídrica) nas avaliações de área foliar, altura de plantas, peso de plantas e de raiz.....	69
TABELA 5D	Teste de Dunnett ($P < 0.05$) para contraste entre médias dos tratamentos (sementes de feijoeiro inoculadas com <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> em meio BSA com restrição hídrica) com a testemunha, inoculação sem restrição hídrica, nas avaliações de área foliar, altura de plantas, peso de plantas e de raiz.....	70

TABELA 1D: Teste de Dunnett ($P < 0.05$) para contraste entre médias dos tratamentos (sementes de feijoeiro inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em meio BSA com restrição hídrica) com a testemunha, inoculação em BSA sem restrição hídrica, nas avaliações de germinação, *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* e outros microrganismos.

SOLUTOS (MPa)	TESTEMUNHA - BSA											
	GERMINAÇÃO				<i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i>				OUTROS			
	36h	72h	108	144	36h	72h	108	144	36h	72h	108	144
Sacarose -0.8	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Sacarose -1.0	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Sacarose -1.2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
KCl -0.8	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
KCl -1.0	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
KCl -1.2	ns	ns	***	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Manitol -0.8	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Manitol -1.0	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Manitol -1.2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Os tempos de cada soluto, em seus diferentes potenciais, foram comparados com os tempos correspondentes às testemunhas, ou seja, sacarose -0.8 36h com BSA 36h, e assim por diante.

*** Significativo (BSA superior aos tratamentos)

TABELA 2D: Teste de Dunnett ($P < 0.05$) para contraste entre médias dos tratamentos (sementes de feijoeiro inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em meio BSA com restrição hídrica) com a testemunha, inoculação sem restrição hídrica, nas avaliações de emergência e índice de velocidade de emergência – IVE.

SOLUTOS (MPa)	TESTEMUNHA - BSA							
	EMERGÊNCIA				IVE			
	36 h	72h	108h	144h	36h	72h	108h	144h
Sacarose -0.8	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Sacarose -1.0	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Sacarose -1.2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
KCl -0.8	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
KCl -1.0	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
KCl -1.2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Manitol -0.8	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Manitol -1.0	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Manitol -1.2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Sem inoculação	ns	ns	ns	***	ns	ns	***	***

Os tempos de cada soluto, em seus diferentes potenciais, foram comparados com os tempos correspondentes às testemunhas, ou seja, sacarose -0.8 36h com BSA 36h, e assim por diante.

*** Significativa (testemunha sem inoculação superior ao tratamento)

TABELA 3D: Teste de Dunnett ($P < 0.05$) para contraste entre médias dos tratamentos (sementes de feijoeiro inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em meio BSA com e sem restrição hídrica) com a testemunha (sem inoculação) nas avaliações de emergência e índice de velocidade de emergência – IVE.

SOLUTOS (MPa)	TESTEMUNHA – Sem inoculação							
	EMERGÊNCIA				IVE			
	36 h	72h	108h	144h	36h	72h	108h	144h
Sacarose -0.8	ns	ns	ns	***	ns	ns	***	***
Sacarose -1.0	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	***
Sacarose -1.2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	***
KCl -0.8	ns	ns	ns	***	ns	ns	***	***
KCl -1.0	ns	ns	ns	***	ns	ns	***	***
KCl -1.2	ns	ns	***	***	ns	ns	***	***
Manitol -0.8	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	***
Manitol -1.0	ns	ns	ns	***	ns	ns	***	***
Manitol -1.2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	***
BSA	ns	ns	ns	***	ns	ns	***	***

Os potenciais de cada soluto, em seus diferentes tempos, foram comparados com os tempos correspondentes às testemunhas, ou seja, sacarose -0.8 36h com BSA 36h, e assim por diante.

*** Significativo (testemunha sem inoculação superior aos tratamentos)

TABELA 4D: Teste de Dunnett ($P < 0.05$) para contraste entre médias dos tratamentos (sementes de feijoeiro inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em meio BSA com restrição hídrica) com a testemunha (inoculação sem restrição hídrica) nas avaliações de área foliar, altura de plantas, peso de plantas e de raiz. UFLA, LAVRAS-MG, 2000.

SOLUTOS (MPa)	TESTEMUNHA - BSA															
	ÁREA FOLIAR				ALTURA DE PLANTAS				PESO DE PLANTAS				PESO DE RAIZ			
	36 h	72h	108h	144h	36h	72h	108h	144h	36h	72h	108h	144h	36h	72h	108h	144h
Sacarose -0.8	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Sacarose -1.0	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Sacarose -1.2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
KCl -0.8	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
KCl -1.0	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
KCl -1.2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Manitol -0.8	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Manitol -1.0	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Manitol -1.2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
S/ inoculação	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns

Os tempos de cada soluto, em seus diferentes potenciais, foram comparados com os tempos correspondentes às testemunhas, ou seja, sacarose -0.8 36h com BSA 36h, e assim por diante.

*** Significativo (BSA superior aos tratamentos)

TABELA 5D: Teste de Dunnett ($P < 0.05$) para contraste entre médias dos tratamentos (sementes de feijoeiro inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em meio BSA com restrição hídrica) com a testemunha, inoculação sem restrição hídrica, nas avaliações de área foliar, altura de plantas, peso de plantas e de raiz. UFLA, LAVRAS-MG, 2000.

SOLUTOS (MPa)	TESTEMUNHA – Sem inoculação															
	ÁREA FOLIAR				ALTURA DE PLANTAS				PESO DE PLANTAS				PESO DE RAIZ			
	36 h	72h	108h	144h	36h	72h	108h	144h	36h	72h	108h	144h	36h	72h	108h	144h
Sacarose -0.8	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Sacarose -1.0	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Sacarose -1.2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
KCl -0.8	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns
KCl -1.0	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
KCl -1.2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	***	ns	ns	***	***	ns	ns	ns	***
Manitol -0.8	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Manitol -1.0	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Manitol -1.2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BSA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns

Os tempos de cada soluto, em seus diferentes potenciais, foram comparados com os tempos correspondentes às testemunhas, ou seja, sacarose -0.8 36h com BSA 36h, e assim por diante.

*** Significativo (Testemunha sem inoculação superior aos tratamentos)