***Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* EM
SEMENTES DE ALGODOEIRO: DETECÇÃO,
INOCULAÇÃO ARTIFICIAL E CONTROLE QUÍMICO**

ANDRÉA CARLA KRAMBECK DA SILVA SANTOS
Engenheira Agrônoma

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ OTÁVIO MACHADO MENTEN

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Fevereiro - 1995

CATALOGACAO NA PUBLICACAO
DIVISAO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTACAO - CAMPUS "LUIZ DE QUEIROZ"/USP

Santos, Andréa Carla Krambeck da Silva

S237f *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro: detecção,
inoculação artificial e controle químico. Piracicaba, 1995.,
68p. ilus.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Algodão - Doença - Controle químico 2. Algodão - Semente - Doença 3.
Fungo fitopatogênico - Inoculação 4. Fusariose do algodão - Controle químico
I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 633.51

***Fusarium oxysporum* f. sp *vasinfectum* EM SEMENTES
DE ALGODOEIRO: DETECÇÃO, INOCULAÇÃO
ARTIFICIAL E CONTROLE QUÍMICO**

ANDRÉA CARLA KRAMBECK DA SILVA SANTOS
Engenheira Agrônoma

Aprovada em: 06.04.1995

Comissão julgadora:

Prof. Dr. ERIC BALMER

- ESALQ/USP

Prof. Dr. JOSÉ OTÁVIO MACHADO MENTEN - ESALQ/USP

Prof.^a. Dr.^a. MARIA ANGÉLICA PIZZINATTO - IAC

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Otávio Machado Menten', is written over a horizontal line.

Prof. Dr. JOSÉ OTÁVIO MACHADO MENTEN
Orientador

Aos meus pais *Lair e Isaías*
Ofereço

Ao meu marido *Celso* e nossos filhos
Pedro Henrique e João Felipe
Dedico

AGRADECIMENTOS

A autora agradece:

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pelas facilidades oferecidas durante a realização deste curso;

Em especial, ao Prof. Dr. José Otávio Machado Menten, pela segura e valiosa orientação, estímulo e constante demonstração de amizade;

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Fitopatologia de ESALQ e aos seus professores;

Aos Professores, Dr. Tasso Leo Krügner, Dr. Eric Balmer, Dr. Hiroshi Kimati e Dr. Clélio Lima Salgado, pelos ensinamentos, constante apoio e amizade;

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo auxílio concedido;

À Dr^a Maria Angélica Pizzinatto, da Seção de Fitopatologia do Instituto Agrônomo de Campinas - IAC, pelo fornecimento do isolado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*;

À Prof^a MS Sônia Maria de Estéfano Piedade do Departamento de Estatística da ESALQ, pela colaboração nas análises estatísticas e ensinamentos;

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, Pedro da Silva, Marina Aparecida G. Pavan, José Edivaldo Buriola, José Rodolfo Groppo e Fernanda Yeda Bassa Groppo, pela dedicação, presteza e amizade.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Fitopatologia, pela amizade;

Aos amigos José Renato Stangarlin, Marise Cagnin Martins, Maria Heloisa Duarte Moraes e Gisele Maria Fantin, pelo companheirismo e colaboração;

A grande amiga e sempre professora, Kátia Regina Freitas Schwan Estrada, pelo carinho e estímulo, fundamentais para a minha formação profissional e realização deste trabalho;

Ao meu sogro Celso Carlos dos Santos e cunhado, José Alfredo dos Santos, pela ajuda e estímulo durante o Curso de Pós-Graduação.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para que este trabalho fosse realizado;

A DEUS, em especial, pois nada me teria sido concedido se não fosse a vontade do Pai.

SUMÁRIO

Pág.

RESUMO	ix
SUMMARY	xii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1. A murcha de <i>Fusarium</i> do algodoeiro	03
2.2. Detecção de <i>Fusarium</i> spp. em sementes de algodoeiro	07
2.3. Inoculação artificial de fungos em sementes de algodoeiro	09
2.4. Tratamento químico de sementes de algodoeiro	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Escolha das amostras de sementes utilizadas nos experimentos	18
3.2. Comparação de métodos para detecção de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> em sementes de algodoeiro	19
3.2.1. Método do papel de filtro	20
3.2.2. Método do papel de filtro com congelamento (MENTEN, 1988)	21
3.2.3. Método do papel de filtro embebido em solução de Dicloran	21
3.2.4. Método do plaqueamento em BDA	22
3.2.5. Método do plaqueamento em meio PCNB de Nash & Snyder (TUITE, 1969)	22
3.3. Inoculação artificial de sementes de algodoeiro com <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i>	24

3.4. Comparação de fungicidas para o controle de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i> em sementes de algodoeiro	26
3.4.1. Fungitoxicidade <i>in vitro</i>	26
3.4.1.1. Produção de inóculo	26
3.4.1.2. Fungicidas testados	26
3.4.1.3. Preparo do meio de cultura com fungicida	27
3.4.2. Fungitoxicidade <i>in vivo</i>	29
3.4.2.1. Sementes e fungicidas utilizados	29
3.4.2.2. Teste de sanidade de sementes	30
3.4.2.3. Teste de germinação	31
3.4.2.4. Teste de emergência em areia	32
4. RESULTADOS	33
4.1. Escolha das amostras de sementes utilizadas	33
4.2. Comparação de métodos para detecção de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> em sementes de algodoeiro	35
4.3. Inoculação artificial de sementes de algodoeiro com <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i>	37
4.4. Comparação de fungicidas para o controle de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i> em sementes de algodoeiro	38
4.4.1. Fungitoxicidade <i>in vitro</i>	38
4.4.2. Fungitoxicidade <i>in vivo</i>	39
4.4.2.1. Teste de sanidade de sementes	39
4.4.2.2. Teste de germinação	40
4.4.2.3. Teste de emergência em areia	42

5. DISCUSSÃO	43
5.1. Comparação de métodos para detecção de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> em sementes de algodoeiro	43
5.2. Inoculação artificial de sementes de algodoeiro com <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i>	45
5.3. Comparação de fungicidas para o controle de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> em sementes de algodoeiro	48
6. CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

RESUMO

Fusarium oxysporum f. sp. *vasinfectum* EM SEMENTES DE ALGODOEIRO: DETECÇÃO, INOCULAÇÃO ARTIFICIAL E CONTROLE QUÍMICO

Autora: ANDRÉA CARLA KRAMBECK DA SILVA SANTOS

Orientador: JOSÉ OTÁVIO MACHADO MENTEN

A murcha de *Fusarium* do algodoeiro, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Atk) Snyder & Hansen, é uma das doenças mais importantes da cultura. Quando não se dispõe de cultivares resistentes, o seu controle deve envolver o emprego de sementes livres do patógeno e/ou o tratamento sistemático de sementes com fungicidas altamente eficientes, para minimizar a possibilidade de introdução do fungo em áreas isentas.

Sementes da cultivar suscetível Acala Del Cerro, produzidas em região onde a doença tem ocorrido com frequência, foram utilizadas no presente trabalho. Foram comparados cinco métodos de detecção de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes: papel de filtro, papel de filtro com congelamento, papel de filtro com dicloran, meio BDA e meio PCNB. Considerando a recuperação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e a inibição de *Rhizopus* sp., contaminante frequentemente

associado às sementes e que mascara os resultados, determinou-se como sendo o método mais recomendado o do papel de filtro com congelamento.

Como a incidência natural do patógeno em sementes é normalmente baixa ($< 2\%$), determinou-se o método mais adequado de inoculação artificial de sementes, para se dispor de material infectado, em grande quantidade, em condições semelhantes às ocorridas na natureza, para a realização de testes *in vivo*. Foram comparados cinco variações do método de contato das sementes com a colônia do patógeno. Verificou-se que 48 horas de contato, a $20 \pm 2^\circ \text{C}$, 12h luz/12h escuro, proporcionou 99,33% de sementes infectadas, que mantiveram suas condições fisiológicas satisfatórias.

A sensibilidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* aos fungicidas foi determinada através de testes *in vitro* e *in vivo*. Onze tratamentos (fungicidas e misturas) foram comparados quanto a percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), através de medição do diâmetro de colônia em BDA com 0,1; 1; 10 e 100 ppm do produto. Através do cálculo do ED_{50} (concentração que inibe em 50% o crescimento micelial), foram considerados altamente eficientes ($\text{ED}_{50} < 1$ ppm) prochloraz, thiabendazol, benomyl, thiabendazol + thiram e benomyl + thiram; comportaram-se como pouco eficientes ($\text{ED}_{50} = 10\text{-}50$ ppm) carboxin + thiram, captan e thiram; foram ineficientes ($\text{ED}_{50} > 50$ ppm) dicloran, carboxin e PCNB.

No teste *in vivo*, sementes de algodoeiro inoculadas artificialmente com *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* foram submetidas ao tratamento com os

seguintes fungicidas e/ou misturas: benomyl (100 g i.a./100 kg sementes), thiabendazol (180 g i.a./100 kg), prochloraz (50 g i.a./100 kg), benomyl + thiram (50 + 140 g i.a./100 kg) e carboxin + thiram (187,5 + 187,5 g i.a./100 kg). Na testemunha, a incidência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* foi 100% no teste de sanidade pelo método do papel de filtro com congelamento; os tratamentos benomyl; prochloraz e benomyl + thiram, que não diferiram entre si, apresentaram controle superior a 94%; a mistura caboxin + thiram apresentou eficiência em torno de 50%. O tratamento com thiabendazol foi perdido devido a severa incidência de *Rhizopus* sp.

Entretanto, o teste padrão de germinação e a emergência em areia mostraram melhor desempenho de benomyl + thiram, prochloraz e carboxin + thiram. Assim sugere-se que sementes comerciais de algodoeiro, suscetíveis a *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, sejam tratadas com benomyl + thiram, na dose de 50 + 140 g i.a./100 kg de sementes.

SUMMARY

Fusarium oxysporum f. sp. *vasinfectum* IN COTTON SEEDS: DETECTION, ARTIFICIAL INOCULATION AND CHEMICAL CONTROL

Author: ANDRÉA CARLA KRAMBECK DA SILVA SANTOS

Adviser: JOSÉ OTÁVIO MACHADO MENTEN

The cotton Fusarium wilt, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Atk) Snyder & Hansen, is one of the most important diseases of this crop. When resistant cultivars are not available, the disease control must involve the use of seeds free of the pathogen and/or sistematic seed treatment with highly efficient fungicides, to minimize the possibility of pathogen introduction in uninfested areas.

Seeds of the susceptible cultivar Acala Del Cerro, produced in a region where the disease has occurred frequently, were used in this work. Five seed-borne *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* detection methods were compared: blotter, deep-freezing, blotter + dicloran, PDA medium and PCNB medium. Considering the *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* recovering and the contaminant *Rhizopus* sp.

inhibition, the deep-freezing method was the recommended one.

As the natural incidence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in cotton seeds is normally low (<2%), the most adequate method for artificial inoculation, for obtaining a great amount of infected material similar to natural infection, necessary to *in vivo* tests was determined. Five variations of seed-colony contact method were compared. It was observed that the contact for 48 hours, at $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 12h light/12h darkness, produced 99,33% of infected seeds, which keep their physiological conditions in a good level.

The *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* sensibility to fungicides was measured by *in vitro* and *in vivo* experiments. Eleven treatments (fungicides and mixtures) were compared for the percentage of mycelial growth inhibition (PIC), through the measurement of the colony diameter in PDA with 0.1, 1, 10 and 100 ppm of the products. Calculation of ED_{50} (fungicide concentration that reduce the mycelial growth in 50%) allows to consider as highly efficient ($\text{ED}_{50} < 1$ ppm) prochloraz, thiabendazol, benomyl, thiabendazol + thiram and benomyl + thiram; low efficient ($\text{ED}_{50} = 10\text{-}50$ ppm) were carboxin + thiram, captan and thiram; inefficient ($\text{ED}_{50} > 50$ ppm) were dicloran, carboxin and PCNB.

For the *in vivo* assays, artificially *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* inoculated cotton seeds were submitted to the following fungicides and/or mixtures: benomyl (100 g a.i./100 kg seeds), thiabendazol (180 g a.i./100 kg), prochloraz (50 g a.i./100 kg), benomyl + thiram (50 + 140 g a.i./100 kg) and carboxin

+ thiram (187.5 + 187.5 g a.i./100 kg). In the control, the *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* incidence was 100% in the seed health test by the deep freezing method; the treatments benomyl, prochloraz and benomyl + thiram, which did not differ among themselves, presented a control higher than 94%; the carboxin + thiram mixture showed efficiency around 50%. The thiabendazol treatment was lost due to severe *Rhizopus* sp. incidence.

However, the standard germination test and the germination in sand showed better performance of benomyl + thiram, prochloraz and carboxin + thiram. So, it is suggested that commercial cotton seeds, susceptible to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, could be treated with benomyl + thiram, 50 + 140 g a.i./100 kg of seeds.

1. INTRODUÇÃO

A murcha ou Fusariose do algodoeiro, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, é uma das principais doenças do algodoeiro. No Brasil, foi relatada, pela primeira vez, no Nordeste, em 1953. Em São Paulo, a doença foi detectada em 1957/58. O patógeno está presente nas regiões onde, tradicionalmente, se cultiva o algodão.

A principal medida de controle desta doença é a utilização de cultivares resistentes, como IAC-20. Entretanto, o cultivo de materiais resistentes pode ser limitado pelas características tecnológicas indesejáveis, como o comprimento de fibras.

Para a produção de artigos que exigem fibra longa, devem ser utilizados cultivares com esta característica. A mais utilizada no Nordeste do Brasil é Acala Del Cerro, altamente suscetível a *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Neste caso, devem ser empregadas outras medidas de controle, simultaneamente ou em sequência, para manter a doença em baixos níveis.

Fusarium oxysporum f. sp. *vasinfectum* é disseminado através do vento, partículas de solo contaminado e, principalmente, sementes. O patógeno, uma vez introduzido na área, permanece viável por muito tempo, por produzir clamidosporos e

por infectar outros hospedeiros, mesmo sem manifestação de sintomas. Assim, entre as medidas que podem ser utilizadas no controle integrado da murcha de *Fusarium* em cultivares suscetíveis destaca-se a utilização de sementes livres do patógeno e plantio em novas áreas. Para diminuir a possibilidade de transporte do patógeno pela semente e sua introdução em áreas isentas, pode-se também, adotar o tratamento sistemático das sementes com fungicidas altamente eficientes.

Para que estas medidas sejam adotadas há necessidade de se dispor de um método seguro e eficiente para detecção de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro e de tratamento fungicida adequado. Como o transporte natural do patógeno pela semente é normalmente baixo, é necessário o desenvolvimento de método de inoculação artificial de sementes que garanta alto nível de sementes infectadas; este material é essencial para a realização de testes de fungitoxicidade *in vivo* através do tratamento de sementes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A murcha de *Fusarium* do algodoeiro

A murcha de *Fusarium* ou fusariose do algodoeiro, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Atk) Snyder & Hansen, pode ser considerada uma das principais doenças que ocorre na cultura. RUANO (1984), cita que esta doença foi descrita pela primeira vez em 1892, no Alabama, USA, por Atkinson.

Trabalhos pioneiros conduzidos por SMITH & LEWIS (1906) objetivaram o levantamento da doença no Estado da Georgia, estudos de adubação, época de plantio, reação varietal, melhoramento, rotação de cultura e distribuição de sementes de variedades resistentes de algodoeiro, visando o controle da murcha de *Fusarium*.

No Brasil, TAVARES (1923) foi, provavelmente, o primeiro a alertar sobre o problema da murcha de *Fusarium* do algodoeiro. Segundo KRUG (1936), esta doença foi detectada, pela primeira vez no Brasil, no estado da Paraíba, em 1935, sendo confirmada a identificação do *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Somente em 1959, CRUZ (1959), relatou a murcha de *Fusarium* do algodoeiro em vários municípios da região Oeste do Estado de São Paulo.

Perdas consideráveis na produção podem ser observadas em variedades suscetíveis, da ordem de 25 a 50% (SMITH & LEWIS, 1906) e, em alguns casos, morte de até 50% das plantas na lavoura (WALKER, 1930), devido a murcha de *Fusarium* do algodoeiro.

As plantas doentes podem apresentar sintomas variáveis, na dependência do grau de resistência da variedade, das condições climáticas e da idade da planta. Quando o patógeno incide em plantas novas, observa-se um amarelecimento e escurecimento dos cotilédones, progredindo para a morte das plântulas. Em plantas adultas, observa-se perda de turgescência, amarelecimento com posterior necrose das folhas basais. As plantas afetadas são frequentemente subdesenvolvidas e apresentam capulhos menores (TANAKA, 1982).

O fungo coloniza as raízes das plantas e infecta o xilema (WALKER, 1930), podendo ser encontrado desde as traquéias das raízes até as nervuras secundárias das folhas (MILANEZ & JOFFILY, 1941). Devido a obstrução mecânica do xilema no interior da planta, observam-se os sintomas de murcha (WALKER, 1930) e, devido a esse tipo de colonização observa-se o escurecimento dos feixes vasculares (CIA, 1977; KAPPELMAN JR & SMITH, 1981; TANAKA, 1982).

Dependendo do potencial de inóculo do fungo no solo, bem como de sua disseminação na área, verifica-se, inicialmente, pequenos focos ou reboleiras de plantas doentes, progredindo, posteriormente, com sucessivos cultivos de algodoeiro na mesma área, por todo o campo (WALKER, 1930).

A doença torna-se mais severa em solos arenosos, fracos, de pH ácido, fertilidade desequilibrada e na presença de *Meloidogyne incognita* (KAPPELMAN JR & SMITH, 1981; TANAKA, 1982). As condições ambientais propícias para o desenvolvimento da murcha de *Fusarium* do algodoeiro são temperatura entre 25 e 33 °C e alta umidade (TANAKA, 1982).

Sob condições de casa-de-vegetação, BALMER et al. (1965) observaram maior incidência de plantas de algodoeiro com sintomas da murcha quando inocularam substratos que continham areia de granulometria média e fina. Posteriormente, SALGADO et al. (1966) verificaram, sob condições de casa-de-vegetação, que substratos contendo maior percentagem de areia favorecem a disseminação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e, devido a isso, a severidade da doença foi mais acentuada nas plantas.

No tocante a influência das deficiências minerais sobre a murcha de *Fusarium* do algodoeiro foi observado, sob condições controladas, que *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* afeta a distribuição e reduz a capacidade de absorção de fósforo. Os sintomas da murcha são modificados na presença de deficiências minerais do solo (CIA, 1977). Na ausência de fósforo, as plantas doentes apresentam-se atrofiadas, com sintomas severos de murcha, e na carência de magnésio, as plantas exibem sintomas de carência deste macroelemento mas não os da murcha (BALMER & HAAG, 1967; HAAG et al., 1967; HAAG et al., 1971).

Segundo WAIKER (1930) e COTTON (s/d), o fungo pode sobreviver no solo, em caules de algodoeiro doentes, e no próprio solo ou na matéria

orgânica do solo por inúmeros anos. KIMATI (1980), por sua vez, comenta que solos contaminados permanecem por períodos indefinidos de tempo nessa condição, não só pelo fato da produção de clamidosporos pelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, mas também devido à sobrevivência do fungo em outros hospedeiros, sem a manifestação dos sintomas.

MENEZES (1972), sob condições de inoculação artificial, verificou que *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* conseguiu infectar abóbora, amendoim, melão e quiabo na ausência de *M. incognita* e, na presença do referido nematóide, foi patogênico a feijão, ervilha, mamona, tomateiro, pepino e melancia. Isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* recuperados dessas plantas foram capazes de infectar o algodoeiro, indicando a preservação da patogenicidade (MENEZES, 1972). Outras plantas são relatadas como hospedeiras de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e, dentre elas, destacam-se o quiabeiro, quiabo-de-cheiro e a papoula-de-São Francisco, existindo a possibilidade do lab-lab ser também hospedeiro do fungo (KIMATI, 1980).

As principais formas de disseminação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* são através de sementes de algodoeiro contaminadas ou infectadas, partículas de terra contaminadas (KIMATI, 1980) e por conídios, através do vento (WALKER, 1930).

Há indícios da existência de variabilidade patogênica entre os isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* no Brasil, pois BALMER & HAAG (1967) encontraram biótipos do referido fungo que diferiram na patogenicidade.

KAPPELMAN JR. & SMITH (1981) relacionaram cinco raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* ocorrendo em vários locais do mundo. Para a diferenciação das raças do patógeno em questão são empregadas algumas variedades diferenciadoras de algodoeiro, soja e fumo, conforme listado na Tabela 1.

Tabela 1. Diferenciação das raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* segundo KAPPELMAN JR. & SMITH (1981).

Raças	<u>Gossypium arboreum</u> "Rozi"	<u>Gossypium barbadense</u> "Ashmoumi" "Sakal"	<u>Gossypium hirsutum</u> "Acala"	<u>Glycine max</u> "Velredo"	<u>Nicotiana tabacum</u> "Gold Dollar"
1	R	S	S	R	R
2	R	S	S	S	S
3	S	R	S	-	R
4	S	R	R	-	S
5	S	S	S	-	-

S = suscetível; R = resistente; - = reação não determinada.

2.2. Detecção de *Fusarium* spp em sementes de algodoeiro

Nos testes de sanidade de sementes de algodoeiro encontram-se relatos sobre a eficiência de diversos métodos para detecção de patógenos, os quais também envolvem diferentes processos de pré-tratamento (deslintamento e desinfecção superficial) e de incubação das sementes. Contudo para a detecção de um determinado patógeno em sementes, deve-se procurar padronizar um método sensível, rápido, simples e reproduzível (PIZZINATTO, 1987; MENTEN, 1988).

MENDONÇA & ALVES (1973) usaram o método do plaqueamento em BDA de sementes deslintadas com ácido sulfúrico. DAVIS (1977) empregando sementes deslintadas com ácido sulfúrico, submeteu-as à assepsia superficial com hipoclorito de sódio por cinco minutos, e incubou-as em papel de filtro umedecido e em BDA. Variações destes métodos foram empregadas por MENEZES et al. (1979), PIZZINATTO et al. (1984) e TANAKA & PAOLINELLI (1984).

SOAVE et al. (1992) relatam os resultados dos testes comparativos de sanidade de sementes de algodoeiro realizados no Brasil, em 1984/85. Dentre os quatros métodos comparados, considerando-se apenas a incidência de *Fusarium* spp., concluíram que o mais apropriado foi o método do papel de filtro, utilizando-se sementes sem linter, pré-tratadas com hipoclorito de sódio e incubadas à 22 °C, por 12 dias, 12h luz/ 12h escuro.

Entretanto, diversos autores têm constatado problemas com *Rhizopus* sp. durante o período de incubação e posterior avaliação nos testes de sanidade de sementes de algodoeiro (LIMA et al., 1982; MACHADO & LANGERAK, 1994). Diversas alternativas para superarem esses problemas estão sendo estudadas. MACHADO & LANGERAK (1994) observaram que a incorporação de baixas doses de produtos químicos tais como dichloran, iprodione, estreptomicina e 2,4-D (sal de sódio) ao papel substrato, tornaram o teste de papel de filtro mais viável de ser utilizado em análise de rotina. Também observaram que o uso de congelamento das sementes, como parte do método de incubação em papel de filtro, é uma alternativa ao uso de 2,4-D. O crescimento acentuado de determinados fungos, como *Rhizopus* sp. e *Botryodiplodia*

theobromae, foi reduzido a níveis aceitáveis para sua detecção e não houve efeito negativo do substrato modificado sobre a ocorrência dos demais fungos, que geralmente, estão associados a sementes de algodoeiro.

Outra alternativa consiste na observação de sintomas em plântulas provenientes de sementes plantadas em areia esterilizada. A incubação de tecidos suspeitos confirmam ou não a presença de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro (RUANO, 1980).

2.3. Inoculação artificial de fungos em sementes de algodoeiro

É de grande interesse a obtenção de sementes infectadas nos processos de inoculação artificial, de maneira semelhante a que ocorre naturalmente, para serem utilizadas em experimentos para avaliar os efeitos sobre as sementes e plântulas, como morte de sementes, tombamento, debilitação de plântulas, transmissão e epidemiologia. Segundo TANAKA & MENTEN (1991), a inoculação artificial das sementes, garante a associação da sintomatologia com o verdadeiro agente causal.

As sementes podem ser inoculadas de diversas maneiras, dependendo da natureza do patógeno. Pode-se misturar às sementes, sadias e desinfestadas superficialmente, esporos secos ou fragmentados de micélio de fungos. Um outro procedimento consiste em mergulhar as sementes em suspensão de inóculo durante cinco a dez minutos e deixar à sombra antes da semeadura (TANAKA, 1987).

COSTA (1939), utilizando sementes de algodoeiro deslintadas com ácido sulfúrico, inoculou-as pelo contato com colônias de *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, crescidos em meio de agar em tubos de ensaio.

TANAKA & MENTEN (1991) citam vários autores que inocularam sementes de algodoeiro, colocando-as em suspensão de conídios (BALMER et al., 1966¹; HALFONMEIRI & VOLCANI, 1977²; LIMA, 1981³; FOLLIN & MANGANO, 1983⁴).

C. gossypii var. *cephalosporioides* foi inoculado com êxito em sementes de algodoeiro da cultivar CNPA-217, com linter ou deslintadas com ácido sulfúrico, mediante o contato das mesmas com colônias do fungo desenvolvidas durante oito dias em meio BDA, em placas de Petri (TANAKA et al., 1989).

¹ BALMER, E.; SALGADO, C.L.; CIA, E.; CAMPOS, H. Efeito do potencial de inóculo de *Colletotrichum gossypii* South. sobre o tratamento das mudinhas do algodoeiro. *Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz"*, Piracicaba, 23: 325-25, 1966.

² HALFON-MEIRI, A. & VOLCANI, Z. A combined method for detecting *Colletotrichum gossypii* and *Xanthomonas malvacearum* in cotton seed. *Seed Science and Technology*, Zurich, 5: 129-39, 1977.

³ LIMA, E.F. Variabilidade de *Colletotrichum gossypii* South. var. *cephalosporioides* A.S. Costa e avaliação da resistência de linhagens de algodoeiro à ramulose. Viçosa, 1981. 47p. (Mestrado-Universidade Federal de Viçosa/UFV).

⁴ FOLLIN, J.C. & MANGANO, V. Etude sur la ramulose du cotonier. *Cotton et Fibres Tropicales*, Paris, 38:209-15, 1983.

TANAKA & MENTEN (1991) compararam três métodos de inoculação de sementes de algodoeiro com *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* quanto à obtenção de sementes infectadas. Os métodos utilizados foram: contato das sementes com a colônia dos fungos durante 24 horas; imersão das sementes em suspensão de conídios durante 30 minutos e secagem ao ar por 2 horas; e imersão das sementes em suspensão de conídios durante 2 horas e secagem ao ar por 16 horas. O primeiro método foi considerado o mais eficiente na obtenção de sementes infectadas. As sementes utilizadas foram da cultivar CNPA-2H, deslindadas com ácido sulfúrico e submetidas à assepsia superficial com hipoclorito de sódio a 1%, durante 3 minutos, seguida de secagem ao ar em papel absorvente, durante 24 horas.

PIZZINATTO & MENTEN (1991), utilizando sementes da cultivar IAC 20, testaram a patogenicidade de oito espécies de *Fusarium*, através de 4 diferentes métodos de inoculação: imersão das sementes em suspensão de inóculo durante 3 horas e semeadura em areia esterilizada; rega com suspensão de inóculo em areia esterilizada e plantio de sementes pré-germinadas; imersão de sementes pré-germinadas em suspensão de inóculo; distribuição de sementes sobre cultura do fungo em placas de Petri. Os autores verificaram que, em condições de casa-de-vegetação, o método de distribuição de sementes sobre cultura do fungo em placas de Petri foi eficiente. As percentagens dos isolados de *Fusarium* spp, constatadas nas sementes dos tratamentos (espécies de *Fusarium*) foi em torno de 100%.

2.4. Tratamento químico de sementes de algodoeiro

Na cultura do algodoeiro há redução na produção devido a ocorrência de várias doenças, cujos agentes causais são transportados e/ou transmitidos pelas sementes (PIZZINATTO, 1986). Neste particular, o autor destaca as seguintes doenças: murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*); murcha de verticillium (*Verticillium dahliae*); antracnose (*Colletotrichum gossypii*); ramulose (*C. gossypii* var. *cephalosporioides*); mancha angular (*Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*); tombamento (*Ascochyta gossypii*, *Botryodiplodia theobromae*, *C. gossypii*, *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *X. campestris* pv. *malvacearum*); podridão de maçãs (*A. gossypii*, *B. theobromae*, *C. gossypii*, *Fusarium* spp., *Phoma* sp. e *X. campestris* pv. *malvacearum*); manchas foliares (*Alternaria tenuis* e *Ascochyta gossypii*).

A germinação e o vigor das sementes podem ser prejudicados por patógenos presentes nas sementes; tal fato foi observado por LIMA et al. (1984), que estudaram a influência de *Aspergillus niger*, *A. flavus* e *Rhizopus* sp. na deterioração de sementes de algodoeiro durante o armazenamento.

Segundo CIA (1977), é muito importante que cuidados sejam tomados na introdução de sementes em regiões onde ainda não tenha sido relatada a ocorrência da fusariose. Uma vez introduzido em uma área, o organismo sobrevive por longos períodos como saprófita facultativo, infectando hospedeiros alternativos ou através de estruturas de sobrevivência (CIA, 1977; KIMATI, 1980; KAPPELMAN JR. &

SMITH, 1981). Embora a disseminação do patógeno possa ocorrer por partículas do solo contaminado, através do vento ou da água, as sementes são muito mais eficientes, particularmente a grandes distâncias (CIA, 1977; KIMATI, 1980).

Além dos patógenos veiculados pela semente, os microrganismos do solo provocam apodrecimento de sementes e morte de plântulas em pré e pós-emergência.

De acordo com o tipo, o tratamento de sementes pode ser classificado em físico, bioquímico, biológico e químico.

Com o tratamento químico de sementes objetiva-se controlar e proteger as sementes e plântulas dos microrganismos das sementes, do solo e dos que atacam posteriormente. Visa-se a obtenção de um bom "stand", redução de perdas e evitar a disseminação de organismos patogênicos (LASCA, 1986; RUANO et al., 1989).

No controle químico, que é o mais utilizado, inclui-se todos os tratamentos em que se usam produtos químicos para tratar as sementes, tais como fungicidas, inseticidas, nematicidas, etc. Esses produtos podem estar na forma de líquido, pó seco, pó molhável e "slurry" (LASCA, 1986). A eficácia do tratamento depende do lote de sementes, época de semeadura, condições ambientais durante a germinação e emergência, além de outros fatores (RUANO et al., 1989).

Entre as vantagens que o uso de fungicidas em tratamento de sementes apresenta está o fato de ser medida econômica, de fácil aplicação, que oferece boa proteção na primeira fase do ciclo da cultura. É, entretanto, medida complementar, que deve ser acompanhada de outras medidas de controle (LASCA, 1986).

Na década de 60 iniciou-se, no Brasil, a realização de trabalhos científicos a respeito do tratamento químico das sementes de algodão, utilizando-se diferentes tipos e formulações de fungicidas e também, ácido sulfúrico, para o controle do tombamento de plântulas. A metodologia de avaliação empregada nesses trabalhos era, na sua maioria, baseada na emergência e no tombamento de plântulas, em condições de campo, sem nenhuma observação acerca da sanidade das sementes testadas. Em alguns trabalhos procurava-se também determinar os agentes patogênicos responsáveis pelo tombamento, bem como o efeito do tratamento sobre a produção da cultura.

ABRAHÃO & ANDRADE (1961) observaram que a percentagem de emergência das sementes tratadas com compostos de etil, fenil e metilmercúrios foi superior a daquelas tratadas com fungicidas não mercuriais: captan, PCNB e thiram. Contudo, nenhum dos tratamentos mostrou efeito sobre a produção de algodão. TOLEDO (1961) também demonstrou que o tratamento com fungicidas mercuriais e o deslincamento com ácido sulfúrico foram benéficos à germinação das sementes de algodoeiro.

Segundo PIZZINATTO (1986), a época da proibição do uso de fungicidas mercuriais, no Brasil, praticamente coincide com o início da utilização de fungicidas sistêmicos para o tratamento de sementes de algodoeiro. Assim sendo, SATO et al. (1974) constataram que os melhores resultados no controle do tombamento foram obtidos com o tratamento de sementes com benomyl, e com as misturas benomyl + thiram + chloronil e thiram + PCNB.

MARCOS FILHO & FERRAZ (1975) e MARCOS FILHO & PERRI JUNIOR (1977) concluíram que thiram e PCNB + etridiazol protegeram a qualidade das sementes de algodoeiro, baseando-se em resultados de testes de germinação e de vigor das sementes. A eficiência de thiram também foi observada na conservação de sementes de algodão armazenadas por 21 meses. MAEDA et al. (1976) apresentaram resultados de testes de germinação de 87% e 41%, respectivamente, para sementes tratadas e não tratadas com thiram.

REBOLHO et al. (1979) demonstraram a eficiência dos tratamentos com benomyl, benomyl + thiram e carboxin + thiram, e do deslintamento com ácido sulfúrico, no controle do tombamento provocado, principalmente, pelos patógenos *R. solani* e *Fusarium* sp.

SOAVE (1984) relata que os fungicidas que apresentaram melhor performance no tratamento de sementes da malvácea foram PCNB + thiram, benomyl + thiram + chloroneb, PCNB + carboxin. Relatou ainda que muitas das pesquisas sobre tratamento químico de sementes de algodoeiro não mostraram eficiência de fungicidas, provavelmente devido às sementes não terem sido analisadas patologicamente antes do tratamento, aplicando-se produtos que não tenham eficiência contra os patógenos envolvidos. Sugere, ainda, que no plantio comercial do algodoeiro utilizem-se sementes deslintadas, porque no línter estão abrigados cerca de 70% dos fungos encontrados nas sementes. O deslintamento com ácido sulfúrico, por si só, já melhora a qualidade sanitária dos lotes de sementes, melhorando também sua germinação.

Avaliando emergência e resistência a fungos do tombamento (predominância de *R. solani*), CIA et al. (1980) observaram que fungicidas a base de benomyl e de PCNB + thiram apresentaram um bom efeito sobre sementes tratadas e armazenadas por 7 e 16 meses, respectivamente.

A partir de 1985, observa-se a realização de trabalhos científicos, nos quais utilizaram-se tanto testes fisiológicos como de sanidade de sementes, para a avaliação do efeito dos fungicidas sobre determinados microrganismos.

SOAVE (1984) relata que existe relação entre a quantidade e qualidade de patógenos presentes nas sementes de algodoeiro e a percentagem de germinação e de vigor e a densidade da semente. PIZZINATTO et al. (1991) observaram a relação entre densidade e qualidade de sementes de algodoeiro e concluíram que não houve influência da densidade de sementes de algodoeiro na germinação e na sanidade das sementes produzidas pelas plantas delas resultantes.

Dessa forma, pode-se recomendar o uso de um fungicida específico para o controle de um certo patógeno, pois fungicidas eficientes, com amplos espectros de ação, são poucos comuns.

Fusarium spp. foi eficientemente controlado por benomyl e captan, não sendo por PCNB e captafol + PCNB. No controle de *Colletotrichum gossypii* destacaram-se benomyl, thiram, thiram + iprodione, guazatine, guazatine + imazalil, thiabendazol, PCNB, prochloraz (45 CE) e captan (FURLAN et al., 1985; FURLAN & MENTEN, 1986; JULLIATTI et al., 1986a e b e ABRATES, 1986). Em 1986 o ABRATES/COPASEM recomendou o uso de benomyl, benomyl + thiram, carboxin +

thiram e captan no controle de *Fusarium* spp. GOULART (1992) obteve bom controle de *Fusarium* spp. com a mistura pencycuron + tolifluanid.

MELOTTO et al. (1976) demonstraram a eficiência do tratamento de sementes com os fungicidas PCNB, pyracarbolid e carboxin, para o controle do tombamento de plântulas de algodão em solo infestado por *Rhizoctonia solani*. ABRATES/COPASEM (1986) recomenda o uso de benomyl, benomyl + thiram, carboxin + thiram, PCNB + thiram, PCNB, pyracarbolid e carboxin. Observou-se redução do tombamento com os seguintes fungicidas: tolylfluanid, pencycuron, captan e benomyl (GOULART, 1992); thiram, benomyl + captan, benomyl, PCNB, PCNB + thiabendazol, tiofanato metilico + captan, thiabendazol, PCNB + benomyl, tiofanato metilico, captan e thiram + iprodione (NUNES JR. et al., 1986); benomyl + thiram e PCNB + captafol (ZAMBOLIN & VIEIRA, 1986); carboxin + thiram, captafol + PCNB, metiltiofanato, benomyl + thiram, pepronil + captan e thiram + PCNB (RUANO et al., 1989); PCNB + benlate + captan, carboxin + captan e PCNB + carboxin + captan (CARVALHO et al., 1984).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos em laboratórios, câmara de crescimento e casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), em Piracicaba, SP, no período de julho de 1991 a julho de 1992.

3.1. Escolha das amostras de sementes utilizadas nos experimentos

Foram recebidas 13 (treze) diferentes amostras de sementes de algodoeiro, cv. Acala Del Cerro, produzidas em Juazeiro-BA, safras 1989 e 1990, em áreas sujeitas à ocorrência de murcha de fusarium (Tabela 2).

A incidência de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, bem como a de *Fusarium* spp. e *Rhizopus* sp. nas sementes foi detectada através do método do papel de filtro (NEERGAARD, 1979) e método do papel de filtro com congelamento, sugerido por MENTEN (1988). Foram utilizadas 200 sementes para cada método, sendo 4 repetições de 50 sementes.

Tabela 2. Sementes de algodão, cv. Acala Del Cerro, procedentes de Juazeiro, BA, analisadas para seleção das mais adequadas ao desenvolvimento dos experimentos.

Amostra	Código	Safra	Caracterização
01	17/27 cL	1990	Com línter; campo com 2,5% de plantas com sintomas.
02	17/27 dL	1990	Deslntado no laboratório da ESALQ; campo 2,5% de plantas com sintomas.
03	28 cL	1990	Com línter; campo com 1,9% de plantas com sintomas.
04	28 sL	1990	Sem línter; campo com 1,9% de plantas com sintomas.
05	Áreas azuis	1990	Sem línter; campo com 0,7% a 3,6% de plantas com sintomas.
06	11 cL	1989	Com línter.
07	11 sL	1989	Sem línter.
08	16 A cL	1990	Com línter; sem evidências de plantas com sintomas.
09	16 A sL	1990	Sem línter; sem evidências de plantas com sintomas.
10	18 C sL	1990	Sem línter; sem evidências de plantas com sintomas.
11	18 B sL	1990	Sem línter; sem evidências de plantas com sintomas.
12	16 C sL	1990	Sem línter; sem evidências de plantas com sintomas.
13	Área pivô	1990	Sem línter.

3.2. Comparação de métodos para detecção de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro

As sementes da amostra 13, escolhidas para o presente trabalho, foram deslntadas com ácido sulfúrico comercial concentrado (96-98%), na proporção de 20 ml para cada 100g de sementes. As sementes, em contato com o ácido, foram

revolvidas com um bastão de vidro durante cerca de 5 minutos e, à seguir, lavadas várias vezes em água corrente e postas a secar à sombra (COSTA & SANTOS NETO, 1940).

Sementes deslintadas foram submetidas aos seguintes métodos de detecção: papel de filtro, papel de filtro com congelamento, papel de filtro embebido em solução de dicloran, meio BDA e meio de PCNB. Foram utilizadas 400 sementes para cada método, sendo 4 repetições de 100 sementes (BRASIL, 1992); o delineamento experimental foi inteiramente ao acaso.

3.2.1. Método do papel de filtro (NEERGAARD, 1979)

Este método consistiu na incubação das sementes em placas de Petri de plástico, de 9 cm de diâmetro, contendo 3 folhas de papel de filtro. com densidade de 80 g/m² e umedecidas com água destilada. As placas, contendo cada uma 10 sementes equidistantes entre si, foram colocadas durante 7 dias a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas de escuro e 12 horas de luz, fornecidas por lâmpadas fluorescentes tipo "luz do dia" GE 40 Watts, a 40 cm das placas. Antes do plaqueamento, foi feita a assepsia superficial através da imersão das sementes em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 3 min.

3.2.2. Método do papel de filtro com congelamento (MENTEN, 1988)

As sementes foram distribuídas em placas de Petri plásticas, com 9 cm de diâmetro, contendo 3 discos de papel de filtro de mesmo diâmetro das placas com densidade 80 g/m² embebidos em água destilada. As placas, contendo cada uma 10 sementes equidistantes entre si, foram incubadas durante 24 horas à temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Em seguida, foram submetidas a congelamento à temperatura de -18°C , por 24 horas no escuro, e reconduzidas à câmara de incubação por mais 5 dias, nas mesmas condições anteriormente descritas.

3.2.3. Método do papel de filtro embebido em solução de dicloran

Este método teve como finalidade inibir o crescimento de *Rhizopus* sp., contaminante de sementes de algodoeiro. Consistiu na utilização de 3 discos de papel de filtro umedecidos em solução de dicloran, na concentração de 2 g de Alisan por litro de água destilada, colocados no fundo de placas de Petri de plástico transparente de 9 cm de diâmetro. As placas, contendo cada uma 10 sementes equidistantes entre si, foram incubadas durante 7 dias a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas de escuro e 12 horas de luz.

3.2.4. Método do plaqueamento em BDA

Foram utilizadas placas de Petri de vidro "pyrex" esterilizadas, de 10 cm de diâmetro contendo aproximadamente 20 ml de BDA (200 g de batata, 20 g de dextrose e 20 g de agar por litro) cada uma. As sementes foram submetidas à assepsia superficial com hipoclorito de sódio 1%, por 3 min. As placas, contendo cada uma 5 sementes equidistantes entre si, foram colocadas durante 7 dias a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas escuro, 12 horas luz. As avaliações foram feitas no 7º dia após a incubação, com base nas características típicas da colônia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (MENTEN, 1988).

3.2.5. Método do plaqueamento em meio PCNB de Nash & Snyder (TUIITE, 1969)

Foram utilizadas placas de Petri de vidro "pyrex" esterilizadas, de 10 cm de diâmetro contendo cada uma, aproximadamente, 20 ml de meio PCNB de Nash & Snyder (15 g de peptona Difco, 10 g de KH_2PO_4 , 0,5 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 300 mg de estreptomicina, 20 g de agar e 1 g de pentacloronitrobenzeno por litro). As sementes foram submetidas à assepsia superficial com hipoclorito de sódio 1%, por 3 minutos. As placas, contendo cada uma 5 sementes equidistantes entre si, foram colocadas durante 7 dias a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas escuro, 12 horas luz. As avaliações foram feitas no 7º dia após a incubação.

A avaliação de todos os métodos testados constou da determinação do número de sementes com *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, registrando-se também a ocorrência de *Fusarium* spp. e *Rhizopus* sp. A identificação de cada fungo foi efetuada de acordo com as características morfológicas observadas, empregando-se microscópio estereoscópico (BOOTH, 1971; NEERGAARD, 1979). Nos casos de dúvida sobre a identidade de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* foram feitas observações no microscópio composto. Essas características foram também comparadas àquelas citadas na literatura (NATH et al., 1970; SINGH et al., 1991). Os dados de sementes portadoras de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, *Fusarium* spp. e *Rhizopus* sp. foram expressos em percentagem. Estes dados não foram analisados estatisticamente, devido à falta de um modelo estatístico para o grande número de "zeros" encontrados.

Em uma segunda etapa, foram utilizadas 3 diferentes amostras de sementes de algodoeiro e os métodos que se destacaram no experimento anterior, sendo o procedimento idêntico ao descrito no item 3.2. O experimento foi feito com quatro repetições de 100 sementes (BRASIL, 1992) e os dados não foram analisados estatisticamente. Estes dados não foram avaliados estatisticamente, pelo mesmo motivo anteriormente citado.

3.3. Inoculação artificial de sementes de algodoeiro com *Fusarium oxysporum*

f.sp. vasinfectum

Para a inoculação artificial de sementes de algodoeiro escolheu-se a amostra 09, por apresentar características adequadas, isto é, sementes com ausência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. O inóculo utilizado, foi uma cultura pura de *Fusarium oxysporum* f.sp.*vasinfectum*, procedente da Seção de Fitopatologia do Instituto Agronômico de Campinas. Este isolado foi também usado nos ensaios subsequentes.

A inoculação artificial das sementes foi feita através do método de contato com a colônia do fungo, em procedimento semelhante ao descrito por TANAKA et al. (1989). Culturas puras de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* foram cultivadas em placas de Petri, com meio BDA, durante 7 dias a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas escuro e 12 horas luz fornecido por lâmpadas de 40 Watts tipo "luz do dia" a 40 cm acima das placas.

Após a assepsia superficial das sementes com hipoclorito de sódio 1%, por 3 minutos e secagem por 12 horas em papel "germitest" ao ar e à sombra, foram colocadas 50 sementes em cada placa com colônias características e manteve-se sob agitação manual por 1 minuto, para que as sementes entrassem em contato com as colônias, permitindo maior contato do inóculo à sua superfície. Como testemunha, foram colocadas e agitadas sementes em placas com meio de cultura BDA, sem o fungo. As sementes foram mantidas em câmara de incubação por 0, 12/luz, 12/escuro, 24 e 48 horas, em contato com as colônias fúngicas, à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo

de 12 horas. Em seguida procedeu-se a secagem das sementes, durante 24 horas, espalhando-as sobre papel "germitest" ao ar e à sombra.

Sementes expostas aos diferentes períodos de contato com a colônia do patógeno foram submetidas ao teste de sanidade pelo método do papel de filtro, de acordo com procedimento descrito em 3.2.1. Metade destas sementes foram submetidas à assepsia superficial através da imersão em hipoclorito de sódio a 1%, por 3 minutos, para a detecção da infecção (estruturas do patógeno no interior das sementes). A outra metade foi analisada sem assepsia superficial, para detecção, além do patógeno infectante, também do contaminante (estruturas do patógeno carregadas na superfície das sementes). Cada parcela experimental foi constituída de 5 placas de 9 cm de diâmetro, com 10 sementes cada, sendo empregadas 150 sementes por tratamento.

Foi utilizado o delineamento estatístico inteiramente ao acaso, com 3 repetições de 50 sementes por tratamento; a análise de variância foi efetuada com os dados em percentagem transformados para arc sen raiz de $x/100$, utilizando-se o teste de Tukey para a comparação das médias.

3.4. Comparação de fungicidas para o controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro

3.4.1. Fungitoxicidade *in vitro*

3.4.1.1. Produção do inóculo

O isolado de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* foi repicado no centro de placas de Petri contendo o meio BDA. Em seguida foram colocadas em câmara de incubação à $20 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas escuro e 12 horas luz. Uma semana após a incubação, as colônias desenvolvidas e características (sem setores) foram utilizadas para os testes. Com o auxílio de um vazador de 5 mm de diâmetro, foram obtidos discos da região periférica da cultura, de acordo com MENTEN et al. (1976).

3.4.1.2. Fungicidas testados

Os fungicidas testados foram: benomyl, thiabendazol, thiram, carboxin, PCNB, prochloraz, carboxin + thiram, dicloran e captan, sendo suas características apresentadas na Tabela 3. Além destes fungicidas, foram utilizadas as misturas benomyl + thiram e thiabendazol + thiram, não encontradas como formulação comercial.

Tabela 3. Fungicidas testados: nome técnico e comercial, fórmulas, grupo químico, classe, concentração do ingrediente ativo e grupo toxicológico.

Produto Técnico	Produto Comercial	Formulação	Grupo químico	Modo de ação	Concentração do ingrediente ativo (g/kg ou l)	Classe Toxicológica
Benomyl	Benlate 500	Pó molhável	Benzimidazóis	Sistêmico	500	III
Thiabendazol	Tecto 100	Pó seco	Benzimidazóis	Sistêmico	900	IV
Thiram	Rhodiauran 700	Pó seco	Ditiocarbamatos	Contato	700	III
Carboxin	Vitavax 750 PM BR	Pó molhável	Anilidas	Sistêmico	750	II
PCNB	Plantacol	Pó molhável	Nitrobenzenos	Contato	750	III
Prochloraz	Prelud 10%	Pó molhável	Imidazois	Contato	100	não registrado
Carboxin + Thiram	Vitavax-thiram PM Uniroyal	Pó molhável	Anilidas e Ditiocarbamatos	Sistêmico + Contato	375 + 375	II
Dicloran	Allisan BR	Pó molhável	Aromáticos	Contato	500	III
Captan	Captan 750 TS	Pó seco	Ftalimidas	Contato	709	III

3.4.1.3. Preparo do meio de cultura com fungicida

O meio de cultura com fungicida foi preparado segundo MENTEN et al. (1976), que adaptou a metodologia de EDGINTON et al. (1971). Todos os produtos foram inicialmente dissolvidos em acetona. Os produtos foram colocados em 5,0 ml do solvente e em seguida o volume foi completado a 100 ml com água destilada esterilizada. Desta solução estoque foi feita diluição em série e tomada uma alíquota constante de 1,0 ml de cada solução e transferida para 100 ml de meio BDA fundente

(45-47°C), de tal forma a se obter concentrações de 0,1; 1; 10 e 100 ppm. A testemunha se constituiu apenas em BDA.

O fungo foi repicado nas placas assim preparadas, colocando-se no centro os discos de 5 mm de diâmetro retirados da região periférica da cultura em BDA, em crescimento ativo. A incubação foi feita em câmara de incubação à $20 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas escuro/12 horas luz.

Cada tratamento constou de 5 repetições, sendo cada uma representada por uma placa. Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado para este experimento. A avaliação foi efetuada 7 dias após a incubação, antes que as hifas do fungo atingissem as bordas das placas. Através da medição do diâmetro médio da colônia, determinou-se o valor da percentagem de inibição do crescimento micelial (P.I.C) (MENTEN et al., 1976):

$$\text{PIC} = \frac{\text{CRESCIMENTO DA TESTEMUNHA} - \text{CRESCIMENTO DO TRATAMENTO}}{\text{CRESCIMENTO DA TESTEMUNHA}} \times 100$$

Correlacionando-se P.I.C com o logarítmo da concentração de fungicida, obtém-se graficamente o valor aproximado de ED_{50} , ou seja, a concentração de produto químico necessária para inibir em 50% o crescimento micelial do fungo (EDGINGTON et al., 1971).

Os produtos químicos foram classificados em quatro categorias de eficiência, segundo escala adaptada de BOLLEN & FUCHS (1970), por EDGINGTON et al. (1971) e KATARIA & GROVER (1978):

- a) $ED_{50} < 1$ ppm : altamente eficiente (A.E.)
- b) $ED_{50} = 1-10$ ppm: moderadamente eficiente (M.E.)
- c) $ED_{50} = 10-50$ ppm: pouco eficiente (P.E.)
- d) $ED_{50} > 50$ ppm: ineficiente (I.)

Os dados não foram analisados estatisticamente.

3.4.2. Fungitoxicidade *in vivo*

3.4.2.1. Sementes e fungicidas utilizados

Todas amostras recebidas foram homogeneizadas formando uma única amostra utilizada para todos os testes *in vivo*. As sementes foram deslintadas (item 3.2) e inoculadas artificialmente de acordo com o método descrito no item 3.3, mantendo-as em contato, por 48 horas, com a cultura do patógeno.

As sementes inoculadas foram tratadas com os fungicidas benomyl (Benlate 500), prochloraz (Prelude 10%), thiabendazol (Tecto 100), carboxin + thiram (Vitavax-Thiram) e benomyl + thiram (Benlate 500 + Rhodiauram), de acordo com os dados da Tabela 4. As sementes tratadas e a testemunha foram submetidas aos testes de sanidade, germinação e emergência em areia. Sub amostras de 123 g de sementes foram

colocadas em Erlenmeyers de 2000 ml, adicionando-se água destilada na proporção de 1,5% da quantidade da semente. Para os fungicidas formulados como pó seco não se adicionou água. Em seguida foram colocados os fungicidas. A testemunha constou de sementes tratadas com água e sem fungicida. Os Erlenmeyers foram agitados durante 5 minutos para que o produto químico aderisse homogeneamente às sementes. Em seguida as sementes repousaram 24 horas sobre papel toalha e foram armazenadas em câmara fria, acondicionadas em sacos de papel, até a sua utilização.

Tabela 4. Fungicidas utilizados para tratamento de sementes de algodão c.v. Acala Del Cerro visando o controle de Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum.

Produto Técnico	Produto Comercial e Concentração (g i.a./kg ou l)	Formulação	Dosagem	
			(g i.a./kg sementes)	(g p.c./kg sementes)
Benomyl	Benlate 500	Pó molhável	100	200
Prochloraz	Prelude 10%	Pó molhável	50	500
Thiabendazol	Tecto 100	Pó seco	20	200
Carboxin + thiram	Vitavax-thiram 750 PM BR (375+375)	Pó molhável	187,5 + 187,5	500
Benomyl + Thiram	Benlate 500	Pó molhável	50 +	100 +
	Rhodiauram 700 +	Pó seco	140	200

3.4.2.2. Teste de sanidade de sementes

As sementes, submetidas aos diferentes tratamentos fungicidas, foram analisadas quanto à incidência de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, de

acordo com o método do papel de filtro com congelamento, descrito no item 3.2.2. O delineamento estatístico empregado foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e quatro repetições de 100 sementes (400 sementes/tratamento). A avaliação foi feita sete dias após a incubação, através de observações das sementes ao microscópio estereoscópio e, no caso de dúvidas, o uso de microscópio composto. Os dados obtidos foram transformados para arc sen raiz de $x/100$ e submetidos a análise de variância, comparando-se as médias pelo teste de Tukey (5%).

3.4.2.3. Teste de germinação

Este teste foi conduzido de acordo com as Regras para Análise de Sementes - R.A.S. (BRASIL, 1992) utilizando-se 4 repetições de 50 sementes (1 rolo por repetição) de cada tratamento, em germinador tipo Mangelsdorf, regulado para manter a temperatura constante de 25°C. Utilizou-se como substrato papel de germinação tipo germitest, umedecido com água na proporção de 2,5 vezes o seu peso, optando-se pelo sistema de rolo. As avaliações foram efetuadas nos 4º e 12º dias após a instalação do teste, segundo os critérios estabelecidos pelas R.A.S., computando-se as percentagens de plântulas normais para cada repetição e obtendo-se, a seguir, a percentagem média de germinação por tratamento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 repetições. Os dados foram transformados para arc sen raiz de $x/100$ e submetidos à análise de variância. Para a comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey (5%).

3.4.2.4. Teste de emergência em areia

Determinou-se a emergência através da semeadura em caixas plásticas de 45 x 30 x 11 cm contendo areia autoclavada, sendo 50 sementes por caixa, distribuídas de forma equidistante, mantidas em casa-de-vegetação. Foram utilizadas 4 repetições de 100 sementes por tratamento. O delineamento estatístico foi o de blocos ao acaso. Na avaliação, realizada 14 dias após a semeadura, foram contadas as plântulas sobreviventes e calculadas as percentagens de emergência. Os dados foram transformados para $\arcsin \sqrt{x/100}$ e submetidos a análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5%).

4. RESULTADOS

4.1. Escolha das amostras de sementes utilizadas nos experimentos

A análise da sanidade das sementes de algodoeiro recebidas mostrou os resultados expressos na Tabela 5.

A amostra 13 foi escolhida para a primeira etapa do experimento de comparação de métodos de detecção (3.2.), porque apresentou maior percentagem de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (infecção natural) e baixa incidência do contaminante *Rhizopus* sp. Para a segunda etapa deste experimento, elegeram-se, além desta, as amostras 6 e 10 por também apresentarem *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* detectado pelo método do papel de filtro com congelamento. Escolheu-se a amostra 09 para o experimento de inoculação artificial (3.3.), pois apresentou baixa incidência de *Rhizopus* sp. e *Fusarium* spp. e não apresentou *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Para a avaliação da fungitoxicidade *in vivo* (3.4.2.), foram utilizadas as sementes de todas as amostras restantes e, inclusive, as sementes das amostras utilizadas para os experimentos anteriores (6, 9, 10, 13), que foram homogeneizadas e transformadas em uma única amostra.

Tabela 5. Incidência de Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum, Fusarium spp. e Rhizopus sp. em 13 amostras de sementes de algodoeiro analisadas por dois métodos, 1991.

Amostra	Método de Detecção					
	Papel de Filtro			Papel de Filtro com congelamento		
	<u>Fusarium</u> <u>oxysporum</u> f. sp. <u>vasinfectum</u>	<u>Fusarium</u> spp.	<u>Rhizopus</u> sp.	<u>Fusarium</u> <u>oxysporum</u> f. sp. <u>vasinfectum</u>	<u>Fusarium</u> spp	<u>Rhizopus</u> sp
01	0	2	14	0	0	12
02	0	0	38	0	0	28
03	0	0	10	0	0	0
04	0	0	46	0	0	34
05	0	0	36	0	2	24
06	0	0	18	2	0	8
07	0	0	30	0	0	12
08	0	0	0	0	4	0
09	0	2	12	0	0	2
10	0	0	0	2	0	6
11	2	0	4	0	0	2
12	0	0	8	0	4	2
13	0	2	14	4	8	0

4.2. Comparação de métodos para detecção de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro

Os resultados obtidos para os diferentes métodos de detecção encontram-se nas Tabelas 6 e 7.

Na primeira etapa deste experimento (Tabela 6) destacaram-se os métodos do papel de filtro com congelamento e método do papel de filtro com dicloran, que apresentaram recuperação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e de *Fusarium* spp, além de proporcionar bom controle de *Rhizopus* sp.

Para a segunda etapa deste experimento (Tabela 7) foram empregados três métodos de detecção: papel de filtro com congelamento, papel de filtro com dicloran e papel de filtro, que é um método muito empregado em rotina pela facilidade de execução. Pode-se observar que, para *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, destacaram-se os métodos do papel de filtro com congelamento e papel de filtro com dicloran para a amostra 13, e os métodos do papel de filtro com dicloran e papel de filtro para a amostra 10.

Quanto a outras espécies de *Fusarium*, o melhor método foi o do papel de filtro com dicloran, seguido do papel de filtro com congelamento e papel de filtro na amostra 13. Os métodos papel de filtro com congelamento e papel de filtro com dicloran apresentaram melhores resultados na amostra 6 e o papel de filtro foi ineficiente. Destacou-se o método do papel de filtro com congelamento seguido do papel de filtro e papel de filtro com dicloran no caso da amostra 10.

Com base nos resultados obtidos nestes experimentos, definiu-se pelo emprego do método do papel de filtro com congelamento para detecção de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes tratadas com fungicidas.

Tabela 6. Incidência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *Fusarium* spp. e *Rhizopus* sp. em sementes de algodoeiro cv. Acala Del Cerro (Amostra 13).

Método de Detecção	Microrganismos (%)		
	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Rhizopus</i> sp.
Papel de filtro	0*	0	3,25
Papel de filtro com congelamento	1,25	1,75	0,25
Papel de filtro com dicloran	2,25	0,25	0,25
Meio BDA	0	0	1,0
Meio PCNB	0	0	0

* Médias de 4 repetições de 100 sementes.

Tabela 7. Incidência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Fusarium* spp. em 3 amostras de sementes de algodoeiro cv. Acala Del Cerro.

Método de Detecção	Amostra	Microrganismo (%)	
		<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	<i>Fusarium</i> spp.
Papel de filtro	06	0*	0
	10	0,25	2,0
	13	0	1,5
Papel de filtro com congelamento	06	0	1,0
	10	0	6,25
	13	0,25	6,75
Papel de filtro com dicloran	06	0	1,0
	10	0,25	0,5
	13	0,25	12,25

* Médias de 4 repetições de 100 sementes.

4.3. Inoculação artificial de sementes de algodoeiro com *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*

Os resultados obtidos para a incidência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* nas sementes inoculadas artificialmente através de diferentes tempos de contato com a colônia, encontram-se na Tabela 8.

A análise de variância mostrou ser significativa, a 5%, a diferença entre os períodos de contato da semente com a colônia, sendo que o tempo de 48 horas foi significativamente superior obtendo-se 99,33% de infecção. O tratamento de 0h (implicou na agitação das sementes por 1 minuto sobre a colônia do patógeno) já possibilitou a recuperação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em 0,67% das sementes. Entretanto, o simples contato da semente com a colônia é suficiente para causar elevada contaminação, não diferindo dos tratamentos com períodos de contato mais elevados para o caso de sementes sem assepsia. As testemunhas (sementes mantidas em contato com o meio de cultura, sem o patógeno, pelos diferentes períodos) apresentaram ausência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*.

Tabela 8. Incidência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro inoculadas artificialmente pelo método do contato com a colônia.

Período de Contato (horas)	Incidência de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> (%)	
	Sem assepsia superficial	Com assepsia superficial
0	99,22 A**	0,67 [*] C
12 (luz)	89,33 A	4,00 C
12 (escuro)	98,67 A	12,67 BC
24	97,33 A	42,00 B
48	99,33 A	99,33 A
C.V. (%)	8,04	29,18

* Média de 3 repetições de 50 sementes.

** Médias seguidas pela mesma letra não diferiram entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey (5%)

4.4. Comparação de fungicidas para o controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro

4.4.1. Fungitoxicidade *in vitro*

Os resultados obtidos para a redução do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* encontram-se na Tabela 9.

Prochloraz, thiabendazol, benomyl, thiabendazol + thiram e benomyl + thiram foram altamente eficientes contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, com destaque para os dois primeiros, que apresentaram $ED_{50} < 0,1$ ppm. Os produtos carboxin + thiram, captan e thiram foram classificados como pouco eficientes. Dicloran, carboxin e PCNB foram considerados ineficientes.

Em função dos resultados obtidos *in vitro* foram selecionados os produtos prochloraz, thiabendazol, benomyl, carboxin + thiram e benomyl + thiram para os experimentos *in vivo*.

Tabela 9. Percentagem de inibição de crescimento micelial de Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum por diferentes fungicidas, *in vitro*.

Tratamentos	Concentração de Fungicida (ppm)				ED ₅₀ (ppm)	Classificação **
	0,1	1	10	100		
Prochloraz	93,3*	100	100	100	< 0,1	A.E.
Thiabendazol	91,9	100	100	100	< 0,1	A.E.
Benomyl	3,8	92	100	100	= 0,3	A.E.
Thiabendazol + thiram	0,6	88,1	100	100	= 0,4	A.E.
Benomyl + thiram	1,9	64	92,2	100	= 0,6	A.E.
Carboxin + thiram	0,6	1,9	13,4	91,9	= 38	P.E.
Captan	2,2	14,7	26,6	78,5	= 36	P.E.
Thiram	3,4	8,6	39,1	76,5	= 50	P.E.
Dicloran	0,9	0,2	34,1	54	= 51	I.
Carboxin	0,1	1,2	2,5	36,4	> 100	I.
PCNB	13,6	22,4	28,4	33,1	> 100	I.

* Média de 5 repetições.

** A.E. = altamente eficiente (ED₅₀ < 1 ppm)
 M.E. = moderadamente eficiente (ED₅₀ = 1-10 ppm)
 P.E. = pouco eficiente (ED₅₀ = 10-50 ppm)
 I. = ineficiente (ED₅₀ > 50 ppm)

4.4.2. Fungitoxicidade *in vivo*

4.4.2.1. Teste de sanidade de sementes

Os resultados dos efeitos dos fungicidas encontram-se na Tabela

O tratamento thiabendazol não pode ser analisado por infestação de *Rhizopus* sp. Os tratamentos benomyl, prochloraz e benomyl + thiram, foram os mais eficientes. Eles reduziram a percentagem de recuperação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* significativamente, ao nível de 5%, não havendo diferença estatística entre eles. Foram seguidos pelo tratamento carboxin + thiram que reduziu a percentagem de recuperação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em relação à testemunha ao nível de 5% de significância.

Tabela 10. Incidência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro inoculadas artificialmente, tratadas com diferentes fungicidas e submetidas ao teste de sanidade pelo método do papel de filtro com congelamento.

Tratamento	Dose g i.a./100 kg semente	Incidência (%)
Benomyl	100	2,25 [*] A ^{**}
Prochloraz	50	5,50 A
Benomyl + thiram	50 + 140	6,00 A
Carboxin + thiram	187,5 + 187,5	46,75 B
Testemunha	-	100,00 C
C.V. (%)		11,08

* Média de 4 repetições de 100 sementes

** Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

4.4.2.2. Teste de germinação

Os resultados do teste de germinação das sementes tratadas estão apresentados na Tabela 11.

Pode-se verificar que os fungicidas benomyl + thiram e carboxin + thiram apresentaram os melhores resultados para a percentagem de germinação

(plântulas normais), não diferindo estatisticamente entre si e nem de prochloraz, ao nível de 5% de significância. Benomyl apresentou a percentagem de germinação mais baixa do experimento, não diferindo estatisticamente da testemunha, ao nível de 5% de significância. A percentagem de germinação do fungicida thiabendazol, não diferiu estatisticamente, ao nível de 5% de significância, dos fungicidas prochloraz e benomyl, que diferiram entre si. Não houve diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% quanto as médias observadas para sementes mortas.

As percentagens de plântulas anormais diferiram estatisticamente e foram inversamente proporcionais às médias de plântulas normais, ao nível de 5% de significância.

Tabela 11. Plântulas normais, anormais e sementes mortas em teste de germinação de sementes de algodoeiro cv. Acala Del Cerro inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* submetidas a tratamentos fungicidas.

Fungicidas	Dose (g i.a./100kg semente)	Plântulas normais (%)	Plântulas anormais (%)	Sementes mortas (%)
Benomyl + thiram	50 + 140	76,5 [*] A ^{**}	16,5 C	7,0 A
Carboxin + thiram	187,5 + 187,5	75,5 A	16,0 C	8,5 A
Prochloraz	50	63,0 AB	29,5 BC	7,5 A
Thiabendazol	20	49,5 BC	39,0 AB	11,5 A
Benomyl	100	36,5 C	51,0 AB	12,5 A
Testemunha	0	33,0 C	58,5 A	8,5 A
C.V. (%)		10,90	14,42	30,44

^{*} Médias de 4 repetições de 100 sementes

^{**} Médias seguidas pela mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Tukey (5%)

4.4.2.3. Teste de emergência em areia

Os resultados obtidos para a percentagem de plantas emergidas encontram-se na Tabela 12.

Os tratamentos benomyl + thiram e prochloraz apresentaram os melhores efeitos quanto a percentagem de emergência de plantas, porém não diferiram estatisticamente, ao nível de 5% de significância, do tratamento carboxin + thiram e testemunha. Para os tratamentos thiabendazol e benomyl, as emergências apresentaram-se abaixo da média do tratamento testemunha, diferindo estatisticamente desta, mas não no tratamento carboxin + thiram.

Tabela 12. Percentagem de emergência em areia de plantas de algodoeiro cujas sementes, inoculadas artificialmente com *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, foram submetidas a tratamentos fungicidas.

Fungicidas	Dose (g i.a./100 kg semente)	Emergência (%)
Benomyl + thiram	50 + 140	84,25* A**
Testemunha	0	83,75 A
Prochloraz	50	81,25 A
Carboxin + thiram	187,5 + 187,5	79,50 AB
Thiabendazol	20	71,75 B
Benomyl	100	71,75 B
C.V. (%)		4,2%

* Médias de 4 repetições de 100 sementes

** Médias seguidas pela mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Tukey (5%).

5. DISCUSSÃO

5.1. Comparação de métodos para detecção de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*

São requisitos básicos para um teste de sanidade de sementes sensibilidade (segurança), repetibilidade, rapidez e economicidade (MENTEN, 1988). No presente trabalho foram comparados cinco métodos para se determinar o mais eficiente na detecção de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro (Tabela 6 e 7). Foram incluídos apenas métodos exequíveis sob condições normais de trabalho em laboratório de patologia de sementes. Existem diversos trabalhos que discutem a diversidade de métodos já empregados (PIZZINATTO, 1987; LIMA et al., 1982). SOAVE et al. (1992) relataram os resultados dos testes comparativos de sanidade de sementes de algodoeiro realizados no Brasil em 1984/85; dentre os quatro métodos comparados, considerando apenas a incidência de *Fusarium* spp., concluiu-se que o mais apropriado foi o método do papel de filtro, utilizando-se sementes sem línfer, pré-tratadas com hipoclorito de sódio e incubadas a 22°C, por 12 dias, 12h/luz/12h escuro.

Entretanto, diversos autores têm constatado problemas com *Rhizopus* sp. durante os testes de sanidade de sementes de algodoeiro (LIMA et al., 1982; MACHADO & LAGERAK, 1994) e buscado diversas alternativas para superá-los.

Neste trabalho, o principal critério para discriminar os cinco tratamentos comparados foi a sensibilidade, ou seja, a capacidade do método detectar as maiores incidências do patógeno alvo nas sementes. Isto inclui a inibição de outros microrganismos menos importantes que podem mascarar ou dificultar a identificação e quantificação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, como é o caso de *Rhizopus* sp. Também foi considerado o risco de se incluir um fungicida em procedimentos rotineiros de laboratório, como é o caso do método do papel de filtro com dicloran.

O requisito rapidez não possibilita nenhuma discriminação, já que o período de incubação foi de 7 dias para os cinco métodos. Já no requisito economicidade, os métodos envolvendo preparo de meios de cultura tiveram desvantagens, pois exigem substratos mais caros e equipamentos/infra-estrutura mais sofisticada, como autoclave, placas de Petri esterilizadas, câmaras asséticas para plaqueamento de sementes, etc.

A Tabela 6 mostrou que os métodos com meios de cultura BDA e PCNB, não proporcionaram recuperação de *Fusarium* spp. e de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. O método do papel de filtro, também não proporcionou boa recuperação destes patógenos, no entanto, é um método de eficiência comprovada, amplamente utilizado para os testes de sanidade de sementes, recomendado pelas Regras de Análise de Sementes - R.A.S. (BRASIL, 1992), inclusive para sementes de algodoeiro, e

sabendo-se que a transmissibilidade de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* é muito baixa, foi incluído nos experimentos cujos resultados estão expressos na Tabela 7.

Considerando-se todos os aspectos, optou-se pelo método do papel de filtro com congelamento, que é bastante prático e recomendado pelas R.A.S. para a maioria das culturas, como cebola, repolho, couve-flor, cenoura, girassol, cevada, arroz, feijão, ervilha, centeio, sorgo, trigo e milho (BRASIL, 1992). Este método possibilitou a recuperação satisfatória de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Fusarium* spp., aparentemente não diferindo do método do papel de filtro com dicloram, que teve destacado desempenho. Deve-se ressaltar que o congelamento reduziu consideravelmente a presença de *Rhizopus* sp., que frequentemente inviabiliza a avaliação pelo seu crescimento vigoroso, tomando toda a placa de Petri.

A repetibilidade dos resultados, importante requisito dos testes de sanidade de sementes, não foi devidamente avaliada. Devem ser realizados testes de aferição através de testes de sanidade de sub-amostras de uma amostra única, portadora de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* submetidas a diferentes laboratórios (SOAVE et al., 1992).

5.2. Inoculação artificial de sementes de algodoeiro com *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*

Sob condições especiais, a maneira mais frequente de associação de patógenos com as sementes é a infecção, ou seja, as estruturas do patógeno estão

localizadas internamente na testa, endosperma ou embrião. No caso de fungos, estas estruturas são hifas latentes, que mantêm a viabilidade e patogenicidade por longos períodos de tempo, além de estarem protegidas contra a ação de fungicidas que não tenham capacidade de penetração nas sementes. É, portanto, de grande interesse a obtenção de sementes infectadas nos processos de inoculação artificial, de maneira semelhante à que ocorre naturalmente, para serem utilizadas em experimentos para avaliar os efeitos sobre as sementes e plântulas, como morte de sementes, tombamento, debilitação da plântula, transmissão e epidemiologia.

Processos de contaminação de sementes através da imersão das mesmas em suspensões de estruturas do patógeno são simples e frequentemente utilizadas. Entretanto, o patógeno fica aderido à superfície da semente, sendo facilmente eliminado ou destruído por fatores adversos. Os resultados deste trabalho (Tabela 8) mostraram claramente que o simples contato das sementes de algodoeiro com a colônia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* possibilitou, praticamente, 100% de contaminação, não havendo diferenças entre os períodos de contato (0 a 48 horas). Este procedimento se assemelha à imersão das sementes em suspensão de esporos e tem como grande inconveniente uma associação patógeno-semente que não simula o que ocorre sob condições naturais (TANAKA, 1990).

Entretanto, a medida que o período de contato semente-colônia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* aumenta, a percentagem de infecção também aumenta; isto é evidenciado na Tabela 8, onde sementes submetidas à assepsia superficial, que é letal às estruturas do patógeno aderidas à superfície da semente, têm

maior incidência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* a medida que ficaram mais tempo em contato com micélio do fungo. Os resultados mostraram que sementes de algodoeiro cv. Acala Del Cerro, com 9,3% de umidade inicial, submetidas a assepsia superficial, necessitam de cerca de 48 horas de contato com colônias de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em meio BDA, à $20 \pm 2^\circ \text{C}$, para atingir praticamente 100% de infecção. Trabalho realizado por PIZZINATO & MENTEN (1991) demonstrou que 24 horas de contato havia sido suficiente para aproximadamente 100% de infecção; entretanto, estes autores utilizaram de outra cultivar (IAC 20), e temperatura de incubação superior (26°C), além da umidade inicial da semente poder estar maior, facilitando a penetração das hifas nos tecidos internos das sementes.

É importante ressaltar que, após as 48 horas de contato semente-colônia do patógeno, a umidade, que imediatamente após a retirada das sementes das placas estava em torno de 42%, em 2 dias de secagem ao ar e à sombra, se estabilizou em 11,3%; portanto, apenas 2 pontos percentuais acima da umidade inicial das sementes. Esta umidade é satisfatória, inclusive permitindo o armazenamento das sementes infectadas e não restringindo sua utilização para logo após a inoculação. Estas observações estão concordando com dados de TANAKA & MENTEN (1991).

Este método de inoculação artificial através do contato direto das sementes com colônias de patógenos tem sido utilizados, com sucesso, para outros sistemas patógeno-hospedeiro (COSTA, 1939; TANAKA et al. , 1989; VALARINI, 1990; TANAKA & MENTEN, 1991; PIZZINATTO & MENTEN, 1991). Uma eventual

desvantagem do método consiste na pequena precisão para padronização do inóculo, o que pode limitar sua utilização em trabalhos que exijam maior precisão.

5.3. Comparação de fungicidas para o controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro

A triagem inicial de fungicidas, quanto à eficiência contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, foi realizada *in vitro*; os resultados obtidos (Tabela 9) estão, de maneira geral, de acordo com os observados por outros autores. EDGINTON et al. (1971) relataram a alta capacidade de inibição de crescimento micelial de *F. oxysporum* por benomyl, determinando seu ED₅₀ como 0,8 ppm, enquanto neste experimento foi de 0,3 ppm. A ineficiência de PCNB a *Fusarium* spp. é bastante conhecida, sendo esta fungitoxicidade o fator de seletividade para preparo de um meio de cultura para isolamento de fungos daquele gênero, o chamado meio Nash & Snyder (TUIITE, 1969). Experimentos *in vivo* também têm confirmado a ineficácia do PCNB para o controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro (JULLIATI, 1986 a e b; FURLAN et al., 1986; FURLAN & MENTEN, 1986).

A fungitoxicidade *in vitro* tem sido utilizada com bastante frequência; produtos com ED₅₀ < 1 ppm têm sido considerados altamente eficientes, de acordo com BOLLEN & FUCHS (1970), EDINGTON et al. (1971) e KATARIA & GROVER (1978). Neste experimento, foram incluídos nesta categoria prochloraz, thiabendazol, benomyl, thiabendazol + thiram e benomyl + thiram.

Como pode ocorrer variação entre o desempenho *in vitro* e *in vivo*, os produtos altamente eficientes, exceto thiabendazol + thiram e carboxin + thiram, foram utilizados para os experimentos *in vivo*; esta última mistura foi incluída apesar de se mostrar pouco eficiente *in vitro*, por ser recomendada para tratamento de sementes de algodoeiro, inclusive para o controle de *Fusarium* spp. (ABRATES, 1986). Além disso, a mistura carboxin + thiram é encontrada como produto comercial no mercado.

Deve-se ainda ressaltar a ineficiência de dicloran, o que reforça a possibilidade do emprego do papel de filtro com dicloran nos testes de sanidade de sementes de algodoeiro para detecção de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Além de controlar bem *Rhizopus* sp., o produto tem pouco efeito sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e possivelmente, *Fusarium* spp; resta saber o seu efeito sobre outros fungos frequentemente associados às sementes de algodoeiro (PIZZINATTO, 1986), fato que poderia limitar sua utilização caso iniba o desenvolvimento de alguns dos patógenos-alvo dos testes de sanidade (BRASIL, 1992).

A fungitoxicidade *in vivo*, através do teste de sanidade de sementes tratadas (Tabela 10), apresentou resultados que concordaram com os testes *in vitro* (Tabela 9); benomyl, prochloraz e benomyl + thiram foram bastante eficientes tanto *in vivo* como *in vitro*, enquanto carboxin + thiram foi pouco eficiente. Esta última constatação é relevante, já que carboxin + thiram é um dos tratamentos mais frequentemente utilizados em sementes de algodoeiro e há citações de sua eficiência contra *Fusarium* spp. (REBOLHO et al., 1979).

Quanto à eficiência de benomyl, os resultados obtidos estão de acordo com os relatados por REBOLHO et al (1979), FURLAN et al. (1985) e GOULART (1992). A mistura benomyl + thiram também foi considerada eficiente por REBOLHO et al. (1979).

Não foi avaliada a eficiência do tratamento de sementes de algodoeiro com thiabendazol devido ao desenvolvimento de *Rhizopus* sp. nas placas de Petri, inviabilizando a detecção e identificação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Este problema já tinha sido observado por MORAES⁵ (1994), ao instalar teste de sanidade com sementes portadoras de *Rhizopus* sp. e tratadas com thiabendazol. Isto sugere o efeito iatrogênico do referido produto, ou seja, há um estímulo ao desenvolvimento de *Rhizopus* sp. pela presença de thiabendazol, seja pela inibição de eventuais antagonistas, ou pela ação estimulante direta. Efeito semelhante já foi causado pelo thiabendazol a outros fungos, como é o caso de *Alternaria* spp. (MENTEN, 1994⁶)

A avaliação de desempenho de fungicidas no tratamento de sementes através do teste de sanidade não é suficiente. Há a necessidade de se observar o efeito dos tratamentos sobre a produção de plântulas normais, com potencial de produzir plantas com boa capacidade de produção. Isto foi mensurado através do teste

⁵ MORAES, M.H.D. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Departamento de Fitopatologia. Comunicação Pessoal, 1994.

⁶ MENTEN, J.O.M. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Departamento de Fitopatologia. Comunicação Pessoal, 1994.

padrão de germinação (Tabela 11), onde thiabendazol e benomyl, nas doses empregadas, podem ter apresentado efeito fitotóxico, expresso por baixa germinação; houve um aumento na percentagem de plântulas anormais provenientes das sementes de algodoeiro tratadas pelos dois produtos nas doses de 20 g i.a. e 100 g i.a./100kg de sementes, respectivamente.

Por outro lado, benomyl + thiram, carboxin + thiram e prochloraz, nas doses utilizadas, mostraram desempenho satisfatório nos testes de germinação. É provável que as condições do teste de germinação tenham permitido desenvolvimento mais ativo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, por encontrar temperatura e umidade mais adequada. Deve-se ressaltar que o teste de emergência em areia, conduzido em casa de vegetação, foi realizado durante o inverno, quando a temperatura média foi mais baixa que a do teste de germinação. Isto pode explicar a maior emergência da testemunha em relação aos tratamentos thiabendazol e benomyl, pois, nas condições do teste de emergência o provável efeito fitotóxico destes tratamentos deve ter sido mais importante que o efeito biológico do patógeno junto à semente e/ou plântula, já que a expressão da doença pode ter sido prejudicada pela temperatura.

Considerando-se os resultados obtidos neste trabalho e os dados existentes na literatura, é possível sugerir o tratamento de semente de algodoeiro com a mistura benomyl + thiram, na dose de 50 + 140 g i.a./100kg sementes para o controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. É provável que a diminuição da dose de benomyl para a metade, em relação ao tratamento com benomyl sozinho, seja responsável pelo desaparecimento de seu provável efeito fitotóxico. Entretanto, outros

experimentos poderão ser realizados, buscando a dose ideal da mistura, ou mesmo de outros produtos, considerando também a variação de sensibilidade ao nível de cultivar e diferentes condições de temperatura e umidade durante a semeadura.

A tendência do tratamento químico de sementes é a utilização da mistura de fungicidas sistêmicos e de contato. Este requisito é contemplado pela mistura benomyl (sistêmico) + thiram (contato). Deve-se ainda considerar que, na prática, a incidência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* é baixa, no máximo em torno de 2%; nestas condições, a utilização de um produto com eficiência de 94%, associado a uma tecnologia adequada de aplicação, pode significar a garantia da eliminação do inóculo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* das sementes de algodoeiro. Entretanto, deve-se ressaltar que a melhor maneira de se evitar a disseminação do patógeno pelas sementes é a obtenção de material sadio, através de manejo adequado do campo de produção, envolvendo inspeções periódicas e "rouguing", e eliminação de lotes de sementes onde o patógeno for constatado (tolerância ou padrão para *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* deve ser zero). O tratamento de sementes deve ser um seguro adicional, considerando a probabilidade da amostra de trabalho, em geral 400 sementes, não possibilitar a detecção do patógeno. Assim, em se tratando de material produzido onde ocorre a murcha de *Fusarium*, mesmo as sementes cujo teste mostrou 0% de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, devem ser tratadas com benomyl + thiram, na dose recomendada.

6. CONCLUSÕES

1. *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* pode ser detectado satisfatoriamente em sementes de algodão através do método do papel de filtro com congelamento, incubação por 7 dias, a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 12h luz do dia/12h escuro.

2. Infecção de aproximadamente 100% de sementes de algodoeiro com *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* se obtém através do contato destas com a colônia do patógeno em meio BDA por 48 horas, a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 12h luz do dia/12h escuro.

3. Tratamento de sementes de algodoeiro com benomyl + thiram, na dose 50 + 140 g i.a./100kg de sementes, proporciona eficiente controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e desenvolvimento satisfatório de plântulas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO, J. & ANDRADE, A.C. Experiência da desinfecção de sementes de algodão no período de 1955-59. **Arquivos do Instituto Biológico**, 28: 133-48, 1961.
- ABRATES. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 2., Campinas, 1986, 8p.
- BALMER, E. & HAAG, H.P. Influências de deficiências minerais sobre a expressão de sintomas de murcha do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) var. IAC 12, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder & Hansen. **Ciência e Cultura**, 19: 450, 1967 (Resumo).
- BALMER, E.; SALGADO, C.L.; CIA, E.; CAMPOS, H. Efeito do potencial de inóculo de *Colletotrichum gossypii* South. sobre o tratamento das mudinhas do algodoeiro. **Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, 23: 325-38, 1966.

BALMER, E.; KIEHL, E.J.; GALLI, F.; CAMPOS, H.; SALGADO, C.; CIA, E.

Contribuição ao estudo da influência dos fatores físicos do solo, sobre a incidência da murcha do algodoeiro, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder & Hansen. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, 22: 247-58, 1965.

BOLLEN, G.J. & FUCHS. On the specificity of the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of benomyl. **Netherland Journal Plant Pathology**, 76:299-313, 1970.

BOOTH, C. **The Genus Fusarium**. Kew, C.A.B., 1971. 237p.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Produção Vegetal. **Regras para Análise de sementes**. Brasília, 1992. Cap. 9, 205-12.

CARVALHO, L.P.; CAVALCANTI, F.B.; LIMA, E.F.; SANTOS, E.O. Influência da ramulose nas características de fibra e produção do algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 9: 593-98, 1984.

CARVALHO, J.M.F.C.; LIMA, E.F.; CARVALHO, L.P. de. Efeito do armazenamento de sementes tratadas com fungicidas no controle do tombamento do algodoeiro. In: REUNIÃO NACIONAL DO ALGODÃO, 3., Recife, 1984. **Resumos**. EMBRAPA/CNPA, 1984, p.173.

- CIA, E. Ocorrência e conhecimento das doenças de algodoeiro *Gossypium hirsutum* L. no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, 3: 167-93, 1977.
- CIA, E.; RODRIGUES FILHO, F.S.O.; SOAVE, J; MAEDA, J.A. & GRIDIPAPP, I.L. Efeito de tratamento com fungicidas na conservação de sementes de algodoeiro, **Bragantia**, Campinas, 39: 59-67, 1980.
- COSTA, A.S. Infestação de sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossypii* South. e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. **Jornal da Agronomia**, Piracicaba, 2:265-72, 1939.
- COSTA, A.S. & SANTOS NETO, J.A. O deslintamento das sementes de algodão pelo ácido sulfúrico em comparação com outros tratamentos. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, 15: 120-132, 1940.
- COTTON DISEASE COUNCIL AND NATIONAL COTTON COUNCIL. Cotton disease and their control. Memphis, Tennessee, s.d. 15 p.
- CRUZ, B.P.B. A fusariose do algodoeiro. **O Biológico**, 25:45-7, 1959.
- DAVIS, R.G. *Fusarium* species in the internal microflora of Mississippi cottonseed. **Seed Science and Technology**, 5: 587-91, 1977.

EDGINGTON, L.V.; KHEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, St. Paul, 61:42-4, 1971.

FOLLIN, J.C. & MANGANO, V. Etude sur la ramulose du cotonnier. **Cotton et Fibres Tropicales**, Paris, 38:209-15, 1983.

FURLAN, S.H. & MENTEN, J.O.M. Efeito do tratamento químico na sanidade e emergência de sementes de soja e algodão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 11: 333, 1986.

FURLAN, S.H.; AMARAL, H.M.; MORAES, M.H.D.; BUENO, J.T.; MENTEN, J.O.M. Efeito de quatro fungicidas na incidência de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium* spp. em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.). e sua relação com o vigor das sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, 8(2): 67-75, 1986.

GOULART, A.C.P. Efeito de fungicidas no controle de patógenos em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum*). **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, 18: 173-77, 1992.

HAAG, H.P.; BALMER, E.; CARVALHO, A. Influência da "murcha de algodoeiro" na composição mineral do algodoeiro. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, 24:333-42, 1967.

HAAG, H.P.; BALMER, E.; KURAMOTO, M. Absorção e distribuição do fósforo no algodoeiro em variedade resistente e suscetível à "murcha do algodoeiro". **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, 28:177-87, 1971.

HALFON-MEIRI, A. & VOLCANI, Z. A combined method for detecting *Colltotrichum gossypii* and *Xanthomonas malvacearum* in cotton seed. **Seed Science and Technology**, Zurich, 5: 129-39, 1977.

JULLIATTI, F.C.; HIRAI, L.T.; SALOMÃO, M.; SILVA, R.A. Eficiência de novas formulações fungicidas no tratamento de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) em Bandeirantes -PR. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 11: 340, 1986a.

JULLIATI, F.C.; OUCHI, S.F.; SCRANIN, O.L.; ZANARDO, J. Efeito dos fungicidas Captafol + PCNB + Thiran no controle de fungos transmissíveis por sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 11: 339, 1986b.

- KAPPELMAN JR., A.J. & SMITH, S.N. Fusarium wilt-nematode complex. In: **Compendium of Cotton Diseases**. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1981. p. 40-41.
- KATARIA, H.R. & GROVER, R.K. Comparison of fungicides for the control of *Rhizoctonia solani* causing damping-off of mung bean (*Phaseolus aureus*). **Annual Applied Biology**, 88:257-63, 1978.
- KIMATI, H. Doenças do algodoeiro - *Gossypium* spp. In: GALLI, F. (coord.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, 1980 v.2, p.29-48.
- KRUG, H.P. Fusarium como causador da murcha do algodoeiro no Brasil. **Rodriguésia**, nº especial, p. 319-21, 1936.
- LASCA, C.C. Tratamento de sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 2, Campinas, 1986. **Palestras**. Campinas, Fundação Cargill, 1986. p. 93-9.
- LIMA, E.F. Variabilidade de *Colletotrichum gossypii* South. var. *cephalosporioides* A.S. Costa e avaliação da resistência de linhagens de algodoeiro à ramulose. Viçosa, 1981. 47p. (Mestrado - Universidade Federal de Viçosa/MG).

LIMA, E.F.; CARVALHO, L.P; CARVALHO, J.M.F.C. Comparação de métodos de análise sanitária e ocorrência de fungos em sementes de algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 7: 401-6, 1982.

LIMA, E.F.; VIEIRA, R.M.; CARVALHO, J.M.F.C. Influência de *Rhizopus* sp., *Aspergillus niger* e *A. flavus* na deterioração de sementes de algodoeiro armazenadas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 9:555-60, 1984.

MACHADO, J.C. & LANGERAK, C.J. Adequação do teste de sanidade ("blotter test") visando detecção de fungos em sementes de algodoeiro. In: REUNIÃO NACIONAL DO ALGODÃO, 7, Cuiabá, 1994. **Resumo**. EMBRAPA, Cuiabá, 1994. p.97.

MAEDA, J.A.; LAGO, A.A.; KRZYZANOLOSKI, F.C.; ORTOLANI, D.O.; RAZERA, L.F.; ZINK, E.; MATTOS, M.; MADEIRA, A.A.; USBERTI, R. Germinação de sementes de algodão tratadas com diversos fungicidas. **Semente**, 2: 8-14, 1976.

MARCOS FILHO, J. & FERRAZ, A.C. Efeitos do tratamento de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), arroz (*Oryza sativa* L.) e soja (*Glycine max* (L.) Merril) com alguns fungicidas não mercuriais. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, XXXII, 497-507, 1975.

- MARCOS FILHO, J. & PERRI JUNIOR, J. Efeitos de tratamentos fungicidas sobre a germinação e o vigor de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), arroz (*Oryza sativa* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **O Solo**, Piracicaba, LXIX: 35-42, 1977.
- MELOTTO, E.; DOI, T.; KUROZAWA, C.; ROSA, V.E. Tratamento de sementes de algodão com fungicidas como medida de controle de "Rizoctoniose". **Revista de Agricultura**, 51: 149-56, 1976.
- MENDONÇA, M. & ALVES, G. Microflora of cottonseed in Mozambique. **Agron. Moçamb.**, Lourenço Marques, 7(4): 207-10, 1973.
- MENEZES, M. Relações entre *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder & Hans e diferentes hospedeiros não suscetíveis. Piracicaba, 1972. 48 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz").
- MENEZES, M.; BEZERRA, J.L. & RAMOS, R.L.B. Microflora fúngica de sementes de quatro cultivares de algodão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 4: 129, 1979.
- MENTEN, J.O.M. Testes de sanidade de sementes. In: SEMANA DE ATUALIZAÇÃO EM PATOLOGIA DE SEMENTES, 1, Piracicaba, 1988. **Palestras**. Piracicaba, FEALQ, 1988. 76 p.

MENTEN, J.O.M.; MACHADO, C.C.; MINUSSI, E.; CASTRO, C.; KIMATI, H.

Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass) Goid *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 1:57-66, 1976.

MILANEZ, F.R. & JOFFILY, J. Estudo sobre a fusariose do algodoeiro. **Rodriguésia**, 5:325-52, 1941.

NATH, R.; NEERGAARD, P.; MATHUR, S.B. **Identification of *Fusarium* species on seeds as they occur in blottler test**. Copenhagen Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, 1970. 26 p.

NEERGAARD, P. **Seed Pathology**. London, McMillan Press, 2 ed., 1979. 1190 p.

NUNES JÚNIOR, J.; MOREIRA, W.A.; CERQUEIRA, W.P.; RATTES, J.F. Avaliação de fungicidas no tratamento de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.). In: REUNIÃO NACIONAL DO ALGODÃO, 4., Belém, 1986. **Resumo**. EMBRAPA/CNPA, 1986. p.103.

PIZZINATTO, M.A. Testes de sanidade de sementes de algodão. In: SOAVE, J. & WETZEL, M.M.V.S., eds. **Patologia de Sementes**. Campinas, Fundação Cargill, 1987. cap. 13, p. 331-46.

PIZZINATTO, M.A. Tratamento de sementes de algodão. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 2, Campinas, 1986. Palestras. Campinas, Fundação Cargill, 1986. p. 111-116.

PIZZINATTO, M.A. & MENTEN, J.O.M. Patogenicidade de oito espécies de *Fusarium*, isoladas de sementes, às plântulas de algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, 17: 125-34, 1991.

PIZZINATTO, M.A.; MENTEN, J.O.M.; SOAVE, J.; CIA, E.; MAEDA, J.A. Relação entre densidade e qualidade de sementes de algodoeiro. **Bragantia**, Campinas, 50(2): 269-89, 1991.

PIZZINATTO, M.A.; SOAVE, J.; CIA, E. Levantamento de patógenos em sementes de seis cultivares de algodoeiro em diferentes localidades no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 9: 101-9, 1984.

REBOLHO, J.T.; CAMARGO, L.M.P.C.A.; FIGUEIREDO, P.; OLIVEIRA, D.A.; CIA, E.; VIEIRA, A.A.; ROCHA, T.R. Tratamento químico de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) visando o controle de agentes causais do tombamento. **O Biológico**, 45:217-224, 1979.

RUANO, O. Comparação de métodos para detecção de fungos associados a sementes de algodoeiro. In: REUNIÃO NACIONAL DO ALGODÃO, IAPAR-EMBRAPA, Londrina, p.120., 1980.

RUANO, O. Resistência do algodoeiro (*Gossypium* spp) a *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder & Hansen e à associação desses organismos. Viçosa, 1984. 38 p. (Mestrado - Universidade Federal de Viçosa).

RUANO, O.; PIRES, J.R.; ALMEIDA, W.P.; YAMAOKA, R.S.; COSTA, A.; MARUR, C.J.; TURKIEWICZ, L. & SANTOS, W.J. Prevenção do tombamento do algodoeiro através do tratamento de sementes com fungicidas. **Informe da Pesquisa**. IAPAR, Londrina, **88**, 1989. 6 p.

SALGADO, C.; CIA, E.; BALMER, E.; MONTEIRO, A.R.; ABREU, C.P. de. Influência da porcentagem de areia no solo e *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood sobre a incidência de murcha de algodoeiro causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder & Hansen. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, 23:311-23, 1966.

SATO, A.S.; NAKAMURA, K.; BANZATO, D.A. & KRONKA, S.N. Efeito do tratamento de sementes com alguns fungicidas no controle do damping-off do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). **Científica**, 2: 175-180, 1974.

SINGH, K.; FRISVAD, J.C.; THRANE, U. & MATHUR, S.B. An illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicilia* and their mycotoxins. Copenhagen Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, 1991. 133 p.

SMITH, R.I. & LEWIS, A.C. "Black root" disease of cotton. **Bulletin of the Georgia State Board of Entomology**, (22): 243-275, 1906.

SOAVE, J. Diagnóstico da patologia de sementes de algodoeiro no Brasil. In: Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes, 1, Piracicaba, 1984. **Anais**. Brasília, ABRATES, 1984. p. 83-86.

SOAVE, J.; PIZZINATTO, M.A.; TANKA, M.A.S.; DO AMARAL, H.M.; BARRETO, N.; BRUNO, R.A.; LEÃO, M.F.; MENTEN, J.O.M.; RUANO, O.; URBEN, A.F. Testes comparativos de sanidade de sementes de algodoeiro realizados e, 1984.954 no Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, 14(2): 119-123, 1992.

TANAKA, M.A.S. Doenças do algodoeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, 8: 70-3, 1982.

TANAKA, M.A.S. Técnicas auxiliares em laboratório de patologia de sementes. In: SOAVE, J. & WETZEL, M.M.V.S., eds. *Patologia de Sementes*, Campinas, Fundação Cargill, 1987. cap.12, p.313-328.

TANAKA, M.A.S. Patogenicidade e transmissão por sementes do agente causal da ramulose do algodoeiro. Piracicaba, 1990. 111 p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ USP).

TANAKA, M.A.S.; MARIANO, M.I.A.; MENTEN, J.O.M. Inoculação artificial de sementes de algodão com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e infecção das sementes em função do tempo de exposição. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, 15: 232-237, 1989.

TANAKA, M.A.S. & MENTEN, J.O.M. Comparação de métodos de inoculação de sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, 17: 218-26, 1991.

- TANAKA, M.A.S. & PAOLINELLI, G.P. Avaliação sanitária e fisiológica de sementes de algodão produzidas em Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 6(1): 71-81, 1984.
- TAVARES, H.A. Uma moléstia do algodoeiro (*Fusarium vasinfecta*). **Boletim de Agricultura**. (3/4): 101-9, 1923.
- TOLEDO, F.F. de. Germinação de sementes de algodão tratadas com modernos fungicidas. **Revista de Agricultura**, 36: 211-214, 1961.
- TUITE, J. **Plant Pathological Methods to Fungae and Bacteria**. Burgess Publ. Company, Mineapolis, 1969. 239p.
- VALARINI, P.J. Método para detecção de *Xanthomonas campestris* pv *phaseolina* em sementes de feijão. Piracicaba, 1990. 167 p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" / USP).
- ZAMBOLIN, L. & VIEIRA, J.M. Incidência e controle de fungos associados ao tombamento de platinhas de algodão na Região Norte do Estado de Minas Gerais. In: REUNIÃO NACIONAL DO ALGODÃO, 4., Belém, 1986. **Resumo**. EMBRAPA/CNPA, 1986. p.104.

WALKER, M.N. Cotton diseases in Florida. **Bulletin of Florida Agricultural Experimental Station**, (214):1-32, 1930.