SELEÇÃO "IN VITRO" E "IN VIVO" DE FUNGICIDAS
E AGENTES BIOLÓGICOS PARA O CONTROLE DE
Didymella bryoniae (Auersw.) Rehm. EM MELÃO
(*Cucumis melo* L.).

ROBERTO MORETZSOHN DE CASTRO
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho de 1994

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

C355s Castro, Roberto Moretzsohn de
Seleção "in vitro" e "in vivo" de fungicidas e
agentes biológicos para o controle *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm em melão (*Cucumis melo* L.).
Piracicaba, 1994.
103p. il.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Controle biológico 2. Crestamento gomoso da
haste do melão 3. Fungo fitopatogênico 4. Fungici-
da - seleção 5. Melão - Doença - Controle I. Esco-
la Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Pira-
cicaba.

CDD 635.65

**SELEÇÃO " IN VITRO " E " IN VIVO " DE FUNGICIDAS E
AGENTES BIOLÓGICOS PARA O CONTROLE DE *Didymella*
bryoniae (Auersw.) Rehm. em MELÃO (*Cucumis melo* L.).**

ROBERTO MORETZSOHN DE CASTRO

Aprovada em: 01.08.1994

Comissão Julgadora: ---

Prof. Dr. Hiroshi Kimati

ESALQ/USP

Prof. Dr. Eric Balmer

ESALQ/USP

Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni

FCA- Botucatu/UNESP

Prof. Dr. HIROSHI KIMATI
Orientador

AGRADECIMENTOS

O autor expressa seus agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Hiroshi Kimati, por sua orientação e apoio durante o desenvolvimento da presente pesquisa;

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de Mestrado durante o curso de Pós-Graduação.

Ao pesquisador Antônio de Goes, pela revisão dos originais;

Ao Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", que possibilitou a participação no curso de Pós-Graduação e a realização deste trabalho;

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, pelos ensinamentos;

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, pela colaboração;

Aos colegas do curso de Pós-Graduação, pelo convívio e amizade;

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xiv
SUMMARY	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Características gerais de <i>Didymella bryoniae</i>	3
2.2 Controle químico de <i>D. bryoniae</i> em cucurbitáceas	12
2.3 Controle biológico	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Obtenção dos isolados	20
3.2 Obtenção das sementes de melão	21
3.3 Testes de patogenicidade	21
3.4 Teste de concentração de inóculo	22
3.5 Controle químico	23
3.5.1 Sensibilidade "in vitro" de <i>Didymella bryoniae</i> a diferentes fungicidas	23
3.5.2 Sensibilidade "in vivo" de <i>D. bryoniae</i> a diferentes produtos químicos	26
3.5.2.1 Efeito protetor de diferentes produtos químicos sobre <i>D. bryoniae</i> , inoculado em plantas de melão	28

3.5.2.2 Efeito erradicante de diferentes produtos químicos sobre <i>D. bryoniae</i> , inoculado sobre plantas de melão	29
3.5.2.3 Efeito curativo de diferentes produtos químicos sobre <i>D. bryoniae</i> , inoculado sobre plantas de melão	29
3.5.2.4 Efeito "imunizante" de iprodione e benomyl sobre <i>D. bryoniae</i> , inoculado sobre plantas de melão	30
3.5.3 Sensibilidade de <i>D. bryoniae</i> inoculado em folhas destacadas, tratadas com diferentes fungicidas.....	31
3.6 Controle biológico	33
3.6.1 Isolamento de bactérias antagonistas a <i>D. bryoniae</i>	33
3.6.2 Seleção das bactérias mais antagonistas	35
3.7 Controle químico x controle biológico	36
3.7.1 Tratamento de sementes	36
3.7.1.1 Inoculação das sementes de melão e transmissibilidade	36
3.7.1.2 Controle químico x controle biológico	38
3.7.2 Efeito do fungicida iprodione e agentes de controle biológico sobre <i>D. bryoniae</i> , inoculado em plantas de melão	39

	Página
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Teste de concentração de inóculo	41
4.2 Controle químico	41
4.2.1 Sensibilidade "in vitro" de <i>D. bryoniae</i> a diferentes fungicidas	41
4.2.2 Sensibilidade "in vivo" de <i>D. bryoniae</i> a diferentes produtos químicos	44
4.2.2.1 Efeito protetor de diferentes produtos químicos sobre <i>D. bryoniae</i> , inoculado em plantas de melão	46
4.2.2.2 Efeito erradicante de diferentes produtos químicos sobre <i>D. bryoniae</i> , inoculado em plantas de melão	56
4.2.2.3 Efeito curativo de diferentes produtos químicos sobre <i>D. bryoniae</i> , inoculado em plantas de melão	59
4.2.2.4 Efeito "imunizante" de Iprodione e Benomyl sobre <i>D. bryoniae</i> , inoculado em plantas de melão	64
4.2.3 Sensibilidade de <i>D. bryoniae</i> inoculado em folhas destacadas, tratadas com diferentes fungicidas	67
4.3 Controle biológico	69
4.3.1 Isolamento de bactérias antagonicas a <i>D. bryoniae</i>	69
4.3.2 Seleção das bactérias mais antagonicas	70

4.4 Controle químico x controle biológico	72
4.4.1 Tratamento de sementes	72
4.4.1.1 Inoculação das sementes de melão e transmissibilidade	72
4.4.1.2 Controle químico x controle biológico	75
4.4.2 Efeito do fungicida iprodione e agentes de controle biológico sobre <i>D. bryoniae</i> , inoculado em plantas de melão	79
5. CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1. Escala de notas (0 - 3) para avaliação da severidade de *D. bryoniae* em hastes de plantas de melão 45
- Figura 2. Desenvolvimento de *D. bryoniae* em haste de melão aos 23 e 33 dias após a inoculação, submetida à aplicação preventiva de fungicidas com 48 horas antecedentes à inoculação 54
- Figura 3. Desenvolvimento de *D. bryoniae* em haste de melão aos 23 e 33 dias após a inoculação, submetida à aplicação preventiva de fungicidas com 24 horas antecedentes à inoculação 55

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1.	Isolados de <i>D. bryoniae</i> utilizados no teste de patogenicidade	20
Tabela 2.	Fungicidas utilizados no teste de sensibilidade "in vitro" de <i>D. bryoniae</i>	24
Tabela 3.	Ingrediente ativo, produto comercial e dosagens utilizadas	27
Tabela 4.	Local de coleta das amostras de solo e respectivas culturas agrícolas	34
Tabela 5.	Porcentagem de inibição do crescimento micelial de <i>D. bryoniae</i> "in vitro" a diferentes fungicidas na concentração de 100 µg/ml	42
Tabela 6.	Valores de ED ₅₀ de vários fungicidas quanto à inibição do crescimento micelial de <i>D. bryoniae</i>	43
Tabela 7.	Efeito protetor de diferentes produtos químicos, isolados ou em combinação, sobre <i>D. bryoniae</i> em folhas de plantas de melão, aplicados 48 e 24 horas antecedentes à inoculação e avaliado 23 dias após a mesma	47

Tabela 8.	Efeito protetor de diferentes produtos químicos, isolados ou em combinação, sobre <i>D. bryoniae</i> em hastes de plantas de melão, aplicados 48 e 24 horas antecedentes à inoculação e avaliado 23 dias após a mesma	51
Tabela 9.	Efeito protetor de diferentes produtos químicos, isolados ou em combinação, sobre <i>D. bryoniae</i> em hastes de plantas de melão, aplicados 48 e 24 horas antecedentes à inoculação e avaliado 33 dias após a mesma	52
Tabela 10.	Efeito erradicante de diferentes produtos químicos, isolados ou em combinação, sobre <i>D. bryoniae</i> em folhas de plantas de melão, avaliado 23 dias após a inoculação	57
Tabela 11.	Efeito erradicante de diferentes produtos químicos, isolados ou em combinação, sobre <i>D. bryoniae</i> em hastes de plantas de melão, avaliado 23 dias após a inoculação	58
Tabela 12.	Efeito curativo de diferentes produtos químicos, isolados ou em combinação, sobre <i>D. bryoniae</i> em folhas de plantas de melão, aplicados 24 e 48 horas posteriores à inoculação e avaliado 23 dias após a mesma	60

Tabela 13.	Efeito curativo de diferentes produtos químicos, isolados ou em combinação, sobre <i>D. bryoniae</i> em hastes de plantas de melão, aplicados 24 e 48 horas posteriores à inoculação e avaliado 33 dias após a mesma	62
Tabela 14.	Efeito imunizante de iprodione e benomyl sobre <i>D. bryoniae</i> inoculado em folhas e hastes de plantas de melão e avaliado 15 dias após a inoculação	65
Tabela 15.	Efeito de diferentes produtos químicos sobre <i>D. bryoniae</i> inoculado em folhas destacadas de melão, avaliado 5 dias após a inoculação	68
Tabela 16.	Porcentagem média de inibição "in vitro" do crescimento micelial de <i>D. bryoniae</i> , por 11 isolados de bactérias	71
Tabela 17.	Porcentagem média da incidência de <i>D. bryoniae</i> em sementes de melão, inoculadas artificialmente sob diferentes concentrações de inóculo e tempos de embebição	73
Tabela 18.	Porcentagem média de transmissibilidade de <i>D. bryoniae</i> em plântulas de melão obtidas de sementes infestadas com diferentes concentrações de inóculo e tempos de embebição	74

Tabela 19.	Avaliação da incidência de <i>D. bryoniae</i> em sementes de melão artificialmente inoculadas, tratadas com fungicidas e com agentes de controle biológico	76
Tabela 20.	Efeito de iprodione e agentes de controle biológico sobre <i>D. bryoniae</i> , inoculado em folhas e hastes de melão, avaliado 15 dias após a inoculação	79

SELEÇÃO " IN VITRO " E " IN VIVO " DE FUNGICIDAS E AGENTES
BIOLÓGICOS PARA O CONTROLE DE *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm. EM
MELÃO (*Cucumis melo* L.).

Autor: Roberto Moretzsohn de Castro

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

RESUMO

O presente trabalho teve por finalidade selecionar fungicidas "in vitro", que se mostrassem eficientes na inibição do crescimento micelial do patógeno, e avaliá-los quanto sua ação preventiva, erradicante e curativa sobre o mesmo, quando inoculado em plantas de melão, em casa-de-vegetação. Objetivou, também, a seleção em laboratório de bactérias antagônicas à *D. bryoniae* e verificar seu efeito, quando pulverizadas sobre o microrganismo, após a inoculação em plantas de melão.

Houve boa correlação entre os fungicidas selecionados "in vitro" com aqueles selecionados "in vivo". Nos ensaios em casa-de-vegetação, benomyl e iprodione foram os fungicidas que apresentaram melhor ação protetora; vinclozolin e iprodione foram aqueles que mostraram melhor efeito curativo sobre as folhas; e na avaliação do efeito erradicante, todos produtos testados forma eficientes.

A aplicação via solo dos fungicidas benomyl e iprodione mostrou efeito

imunizante sobre as plantas de melão, conferindo proteção até o 16º dia após a aplicação.

O uso de folhas destacadas na triagem dos fungicidas mostrou boa correlação com as avaliações "in vivo".

Houve boa correlação entre as bactérias selecionadas "in vitro" com aquelas que melhor se comportaram "in vivo", tendo essas conseguido reduzir a incidência do patógeno em sementes artificialmente inoculadas. Nas plantas de melão o nível de controle se mostrou estatisticamente intermediário com relação à testemunha e ao controle químico.

" IN VITRO " AND " IN VIVO " SELECTION OF FUNGICIDES AND
BIOLOGICAL AGENTS FOR THE CONTROL OF *Didymella bryoniae*
(Auersw.)Rehm. IN MELON (*Cucumis melo* L.).

Author: Roberto Moretzsohn de Castro

Adviser: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

SUMMARY

The goal of this paper was the "in vitro" selection of fungicides that showed high efficiency to inhibit the pathogen mycelial growing, further the evaluation of their preventive, erradicant and curative mode of action on the pathogen inoculated in melon in greenhouse conditions. It also has the goal of laboratory selection of antagonic bacteria to *D. bryoniae* and their effect, when sprayed on the microorganism, after its inoculation in melon.

There was good correlation between "in vitro" and "in vivo" fungicides selected. The experiments with benomyl and iprodione in the greenhouse showed the best preventive action. The vinclozolin and iprodione showed the best curative action on leaves and all products tested had good erradicant efficiency.

When sprayed by soil path iprodione and benomyl presented imunizing effect in melon plants, giving protection until the 16th day after spray.

The use of detached leaves in fungicides screening gave good correlation with "in vivo" evaluation.

There was good correlation between "in vitro" and "in vivo" antagonics bacteria selected, reducing the incidence of the pathogen in artificially inoculated seeds. The statistics of the control level in melon plants was between the untreated and the chemical control.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do melão (*Cucumis melo* L.) vem ocupando importante posição no mercado brasileiro de fruticultura, principalmente no que se refere às exportações. Seu cultivo se dá, praticamente em todas as áreas do Brasil, se destacando aquelas de clima mais quente, como é o caso da região Nordeste do país. A área total de plantio levantada pelo IBGE para o ano de 1991 é de 9.645 ha, sendo o Nordeste responsável por 87 % da produção, onde destacam-se os estados do Rio Grande do Norte, Ceará e Pernambuco (ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL, 1993).

Dentre os diversos problemas que a cultura vêm enfrentando, especial destaque se dá para a doença crestamento gomoso da haste causado por *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm., a qual foi relatada pela primeira vez no Brasil em 1954, em meloeiros na região de Campinas, ocasionando tombamento em plantas jovens, queima nas hastes, manchas foliares e podridão dos frutos, no campo e durante o armazenamento (FIGUEIREDO & CARDOSO, 1964). FIGUEIREDO *et al.* (1966), relataram perdas severas resultantes do ataque do patógeno em aboboreira de moita, no estado de São Paulo. DA MATTA *et al.* (1974) constataram prejuízos, na região Nordeste, em plantas de melão, da ordem de 50%. BALA & FARZAN (1986) estimaram perdas de 10-100% e 16-100% em melão e abóbora, respectivamente, em Trinidad. VIDA *et al.* (1993) avaliaram a incidência do patógeno em culturas de melão, conduzidas em estufas

plásticas, na região de Maringá-PR, registrando índices que variaram de 4,5 a 100% de plantas infectadas, com valores médios de 59,8 % de perdas.

Para se obter o controle da doença, diversas medidas devem estar envolvidas no manejo da cultura; entre elas, o controle químico, por si só, ainda é considerado o mais efetivo. O uso de ditiocarbamatos o qual fôra preconizado por diversos autores (FIGUEIREDO, 1965; FLETCHER & PREECE, 1966), não apresenta, no momento, eficiência satisfatória. Além das características próprias da doença, a eficácia dos fungicidas protetores tem se mostrado limitada dado o fato da contínua produção de ferimentos e da alta densidade das plantas de cucurbitáceas (VAN STEEKELENBURG, 1978).

O presente trabalho teve como objetivo selecionar fungicidas "in vitro", que mostrem-se eficientes na inibição do crescimento do patógeno, e avaliá-los quanto sua ação preventiva, erradicante e curativa sobre o mesmo, quando inoculado em plantas de melão, conduzidas em casa-de-vegetação. Visou, também, a seleção em laboratório de bactérias antagônicas à *D. bryoniae* e seu efeito sobre o patógeno, quando inoculado em plantas de melão.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características Gerais de *Didymella bryoniae*

O Crestamento Gomoso do Caule, Cancro das Hastes, Podridão Negra ou Podridão de Micosferela causada pelo fungo *Didymella bryoniae* (Auersw.)Rehm. (*Ascochyta cucumis* Fautr. and Roum.) foi relatado pela primeira vez por Roumeguere¹ em 1891 na França, sobre folhas de pepino variedade Chinesa (SITTERLY, 1968). Posteriormente, no mesmo ano, Chester² relatou sua ocorrência em Delaware (EUA), nas culturas de melancia (*Citrullus lunatus*), abobrinha italiana (*Cucurbita* sp.), aboboreira (*Cucurbita pepo*), melão (*Cucumis melo*) e pepino (*Cucumis sativus*). No Brasil, foi constatada pela primeira vez em 1954 em plantas de melão da variedade Cantaloupe, na região de Campinas (FIGUEIREDO & CARDOSO, 1964). Em junho de 1964, essa doença foi constatada em plantas de melancia no município de Lutécia no estado de São Paulo (FIGUEIREDO & CARDOSO, 1964). FIGUEIREDO *et al.* (1966) verificaram que a doença estava se tornando cada vez mais séria, afetando

1 ROUMEGUERE, C. Fungi exsiccate precipue gallici. Rev. Mycol., 13: 73-83, 1891.

2 CHESTER, A. Technical Contribution, College of Agriculture and Biological Sciences, No. 687, 1891.

diferentes variedades de abóbora, pepino, melão e melancia em diversas regiões do estado de São Paulo. No Nordeste do Brasil, seu primeiro relato se deu em 1973, em plantas de meloeiro procedentes do estado de Pernambuco, chegando a causar prejuízos superiores a 50% (DA MATTA *et al.*, 1974).

Segundo KIMATI *et al.* (1980), a doença pode ocorrer em todos os órgãos da planta e em qualquer estágio de desenvolvimento. Na plântula, pode causar "damping-off", além de lesões nos cotilédones, que tornam-se necrosados. Nos frutos, os sintomas mostram-se como lesões circulares, inicialmente aquosas, de cor parda, posteriormente pretas, formando depressões nos tecidos, onde pode se verificar exsudação de goma. Nos ramos, o fungo forma lesões necróticas que vão se estendendo, transformando-se em cancrios, podendo haver fendilhamento do córtex, o que pode resultar em morte da planta. Os principais sinais da doença, em qualquer órgão afetado, são a produção de picnídios pretos em grande quantidade, visíveis a olho nu, e a exsudação de goma que pode cristalizar-se na lesão.

Relatos sobre a ocorrência dos sintomas da doença na parte aérea das plantas são comuns, entretanto THINGGAARD (1987) observou em raízes de plantas de pepino a ocorrência da fase sexual do patógeno a qual caracterizava-se pela presença de pseudotécios marrom-escuros erupentes. Segundo aquele autor, picnídios não foram observados naquelas raízes. Tal fato alerta para a importância de tais estruturas na disseminação da doença via solo ou substrato com raízes velhas das plantas.

O fungo foi descrito pela primeira vez em 1891 na sua fase imperfeita

com o nome de *Ascochyta cucumis* Fautr. and Roum. e a fase sexual como *Didymella melonis* Pass. (WIAANT, 1945; CHIU & WALKER, 1949). As nomenclaturas de ambas as fases variaram no decorrer do tempo; para a fase assexual o patógeno já foi denominado de *Phyllosticta citrullina* Chester, *Ascochyta citrullina* (Chester) C.O.Sm., *Diplodina citrullina* (C.O.Sm.) Gross. e *Ascochyta melonis* Poteb. (CHIU & WALKER, 1949); para a fase perfeita CORLETT (1981) designou como sinonímias *Sphaerella bryoniae* Auersw., *Dymosphaeria bryoniae* (Auersw.) Niessl, *Didymella melonis* Pass, *Mycosphaerella melonis* (Pass) Chiu & Walker, *Mycosphaerella cucumis* (Fautr. and Roum.) Chiu & Walker, *Mycosphaerella citrullina* (C.O.Sm.) Gross. e *Sphaerella melonis* Ferraris. CORBAZ (1957) já havia discutido o problema de identificação e separação das espécies de *Didymella* e *Mycosphaerella* apontando algumas características morfológicas para se efetuar tal distinção. Entretanto, foi somente em 1972 que PUNITHALINGAN & HOLLIDAY (1972) descreveram detalhadamente a espécie *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm. A partir dessa data, dentre os trabalhos que relatavam o cancro gomoso da haste, poucos mostraram a nova nomenclatura (LEE, 1977; VAN STEEKELENBURG, 1978; MORALES-BANCE, 1979), quando, no entanto, a grande maioria se utilizava do binômio *Mycosphaerella melonis* (Pass) Chiu & Walker. Pode-se afirmar que foi a partir do momento em que CORLETT (1981) publicou seu estudo taxonômico sobre espécies de *Didymella* é que os autores passaram a usar as nomenclaturas *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm para a fase teleomórfica e *Ascochyta cucumis* Fautr. and Roum. para a fase anamórfica. HANLIN (1990), em descrição recente

dos gêneros de ascomicetos, também colocou tais nomenclaturas como sendo a espécie causadora da podridão gomosa do haste em cucurbitáceas.

GROSSENACHER (1909), objetivando comprovar a patogenicidade dos seus isolados de *Didymella bryoniae*, realizou inoculações com pedaços de micélio, produzido em meio de batata, os quais foram inseridos em ferimentos que atingiram o córtex das hastes das plantas de melão, mostrando sintomas típicos da doença após uma semana. Diversos outros autores (LUEPSCHEN, 1961; FIGUEIREDO & CARDOSO, 1964; LUZ, 1977; VAN STEEKELENBURG, 1982, 1987) também realizaram suas inoculações com fragmentos de micélio introduzidos em ferimentos, ou diretamente sobre a superfície de hastes, folhas e frutos de diferentes cucurbitáceas, alcançando resultados positivos. A maioria dos trabalhos mostra que as inoculações foram preferencialmente efetuadas com suspensões de esporos, normalmente padronizada a 10^6 esporos/ml (VAN STEEKELENBURG, 1978, 1981, 1985a,b, 1986; BERGSTRON *et al.*, 1982; LESKI, 1984; NEERGAARD, 1989; ARNY & ROWE, 1991), e em algumas vezes a 10^5 esporos/ml (VAN STEEKELENBURG & VAN DE VOOREN, 1980; PASCHOLATI, 1980; NORTON & COSPER, 1989), ou ainda a 10^4 esporos/ml (MALATHRAKIS & VAKALOUNAKIS, 1983; ZIV & ZITTER, 1992), para diferentes espécies de cucurbitáceas. No caso de inoculações artificiais de sementes, os autores têm preferido imergi-las em suspensões de esporos por 48 horas (RANKIN, 1954; LEE *et al.*, 1984) ou por até 56 horas (BROWN & PREECE, 1968). As inoculações via solo têm sido feitas cultivando-se previamente o fungo em sementes de cereais e

posteriormente colocando-as na primeira camada do solo, na proporção de 1:1 inóculo-solo estéril (LEE *et al.*, 1984; LEE, 1985), ou ainda através da rega do solo com suspensão de picnidiosporos (DUSI *et al.*, 1993).

Quanto à idade das plantas de cucurbitáceas à época da inoculação, os trabalhos mostram diferentes informações. Alguns autores utilizaram-se de plantas bem novas, como LUZ (1977), que efetuou as inoculações em plantas com 8 dias de idade ou em folhas cotiledonares destacadas mantidas em placas de Petri com papel umedecido; VAN STEEKELENBURG (1981) utilizou plantas no estágio de primeira folha verdadeira; ZAMBRANO-PÉREZ (1972), VAN STEEKELENBURG (1978), PASCHOLATI (1980), MALATHRAKIS & VAKALOUNAKIS (1983), NORTON & COSPER (1989), ARNY & ROWE (1991) utilizaram-se de plantas no estágio de duas folhas verdadeiras; LEE *et al.* (1984), LEE (1985), NEERGAARD (1989) inocularam suas plantas no estágio de terceira folha verdadeira; VAN STEEKELENBURG (1987) e ZIV (1992) utilizaram plantas mais velhas, no estágio de 4-5 folhas verdadeiras. Os diversos outros trabalhos existentes na literatura são referentes a infecções naturais a nível de campo ou casa-de-vegetação.

A avaliação da doença, quando realizada na parte aérea, tem sido normalmente realizada no prazo de uma a duas semanas após a inoculação, utilizando-se uma escala de notas, baseada na porcentagem de tecido vegetal afetado, que pode variar de 0 (sem sintomas) a 4 (tecido vegetal severamente afetado ou morto) (LESKI, 1984; VAN STEEKELENBURG, 1981, 1985a,b; ARNY & ROWE, 1991; DUSI *et al.*, 1993);

ou de 0 (sem sintomas) a 5 (100% do tecido injuriado) (BERGSTROM *et al.*, 1982; NORTON & COSPER, 1989); ou ainda, com menos níveis, passando de 0 (sadio) a 2 (severamente afetado) (VAN STEEKELENBURG, 1978).

Dentre as várias pesquisas realizadas referentes ao comportamento do patógeno, LUEPSCHEN (1961) foi um dos primeiros autores a fazer um estudo acerca do efeito da temperatura no desenvolvimento de *Didymella bryoniae* em frutos de melancia. Dentre as diferentes temperaturas testadas obteve-se o máximo da doença a 24°C, coincidindo com o melhor crescimento do patógeno "in vitro". SCHENCK (1968b), utilizando-se de armadilhas de esporos efetuou coletas de esporângios de míldio de cucurbitáceas (*Pseudoperonospora cubensis* (Berk & Curt) Rostow) e ascosporos de *Didymella bryoniae*, constatando uma diferença na distribuição no tempo, ou seja, esporângios de *P. cubensis* foram coletados em curto período de tempo, enquanto que os conídios do referido segundo patógeno foram coletados durante todo o ciclo da cultura; o autor atribuiu essa discrepância à capacidade saprofítica de *D. bryoniae*. Em trabalhos posteriores, ainda com a cultura da melancia, SCHENCK (1968a, 1969) apontou os ascosporos como sendo os responsáveis pelo inóculo primário da doença e disseminação a longas distâncias, enquanto que os picnidiosporos são os responsáveis pela sua disseminação entre plantas de uma mesma cultura. CARDOSO *et al.* (1974) trabalhando com frutos de abóboreira italiana nas condições do Brasil, também confirmaram os esporos de origem sexual como sendo a principal fonte de inóculo primário nas condições de campo.

VAN STEEKELENBURG (1983), estudando a podridão do fruto e da haste do pepino, observou que após o inverno o estágio conidial é o primeiro a se formar e posteriormente há ocorrência do estágio perfeito, o que vai em desacordo com NEERGAARD (1989), que constatou, ao trabalhar também com plantas de pepino, que uma característica marcante do ciclo de vida de *D. bryoniae* é o aparecimento precoce do estágio perfeito, havendo, apenas tardiamente, a formação de picnídios. VAN STEEKELENBURG (1983) pôde ainda observar que os fatores que determinam a periodicidade da liberação dos ascosporos é a umidade e a ausência de luz, sendo que o pico de liberação se dá logo após o pôr do sol. VAN STEEKELENBURG (1984,1985a,b, 1986), VAN STEEKELENBURG & WELLES (1988) e ARNY & ROWE (1991) chegaram à conclusão de que a umidade e a sua duração são os fatores limitantes na incidência da podridão da haste e frutos de pepino.

Quanto aos estudos de melhoramento genético visando a obtenção de variedades resistentes de melão à *D. bryoniae*, até 1985 somente três cultivares haviam se comportado como resistentes: Chilton, Gulfcoast e Aurora (NORTON,1971, 1972 e NORTON *et al.*, 1985). Com base nesses resultados e alegando que a referida doença só poderia ser controlada quimicamente em condições de tempo normais, isto é, em condições de alta umidade e chuva, tal fato se tornava impossibilitado, NORTON & COSPER (1989), efetuando cruzamentos entre uma variedade suscetível à doença (Georgia 47) e uma introdução resistente (PI 140471), obtiveram a variedade AC-70-154 resistente a tal moléstia. Na literatura brasileira não foram encontrados trabalhos com

relação aos estudos de melhoramento genético de melão, assim como de outras cucurbitáceas, visando a resistência à *D. bryoniae*.

Objetivando o estudo do controle de doenças de plantas através da indução de resistência, PASCHOLATI (1980), empregou plantas de melão dos cultivares Amarelo Tendral e Valenciano Verde, obtendo a melhor proteção em torno de 73 e 88%, respectivamente, quando suspensões de conídios de *Helminthosporium carbonum* foram aplicadas 24 horas antes da inoculação com *D. bryoniae*. MUCHARROMAH & KUC (1991), trabalhando com plantas de pepino, testaram soluções aquosas de ácido oxálico, fosfato de potássio dibásico e tribásico na indução de resistência sistêmica das plantas à bactérias, vírus e uma série de fungos, entre eles *D. bryoniae*, obtendo níveis de proteção ainda inferiores do que aquele induzido por *Colletotrichum lagenarium*.

BALA & FARZAN (1985), estudando o cancro gomoso da haste em plantas de melancia, enumeraram uma série de medidas de controle para essa doença, enfatizando, inclusive, práticas culturais como: remoção dos restos de cultura ou aração profunda; preparação adequada do solo provendo boa drenagem; evitar ferimentos nas hastes, evitar injúrias dos frutos e armazená-los em ambiente de temperatura e umidade controladas. Os autores ainda recomendam a rotação de culturas com espécies de não cucurbitáceas, o que vai de acordo com o trabalho de SITTERLY (1969), que constatou ser o referido microorganismo capaz de sobreviver 18 meses no solo na presença ou não da cultura e, que o melhor resultado de rotação se deu com 24 meses sem culturas suscetíveis.

FIGUEIREDO *et al.* (1970) verificaram que a corola persistente da flor feminina da abóbora de moita (*Cucurbita pepo* L.) é um fator que favorece o ataque de *Didymella bryoniae*, agente causal da podridão estilar dos frutos, doença fúngica, considerada a mais importante no estado de São Paulo. No trabalho foi descrito um método prático de controle que consistiu na eliminação da corola das flores femininas após um período suficientemente longo para garantir a fecundação. Os autores ressaltaram ainda que a eficiência do método poderia ser melhorada se o tratamento químico fosse utilizado.

WIANZ (1945) afirmou que *D. bryoniae* era transmitido via semente, porém, ele não comprovou experimentalmente tal fato. BROWN & PREECE (1968), em experimentos realizados com sementes de pepino, não encontraram evidências de que o patógeno pudesse ser transmitido por sementes. Finalmente, BROWN *et al.* (1970) conseguiram provar a transmissão do patógeno a partir de sementes oriundas de plantas de pepino infectadas. Posteriormente, outros trabalhos comprovaram a transmissão, detecção e localização do patógeno nas sementes de abóbora e pepino (LEE *et al.*, 1984). Mais tarde, no Sri Lanka, JEYANANDARAJAH (1991) detectou a presença de *D. bryoniae* em sementes de pepino e de *Trichosanthes cucumerina* L., não comprovando porém, sua patogenicidade. Para sementes de melão, a transmissão e viabilidade patogênica de *D. bryoniae* fôra demonstrada por LUZ (1977) através de isolamentos do fungo a partir de picnídios formados em sementes e sua inoculação em folhas cotiledonares destacadas.

2.2 Controle Químico de *D. bryoniae* em Cucurbitáceas

O primeiro relato na literatura acerca do tratamento químico de sementes de cucurbitáceas para o cancro gomoso do caule foi publicado por RANKIN (1954) com sementes de melancia tratadas com fungicidas mercuriais e ditiocarbamatos. O tratamento de sementes com 0,1 % de bicloreto de mercúrio através da imersão durante 5 minutos foi o tratamento que se mostrou mais eficiente. Observou ainda que os tratamentos de desinfecção de sementes por via úmida foram mais eficientes do que aqueles por via seca. LUZ (1977) efetuou um estudo para erradicar *D. bryoniae* de sementes de melão; para tanto inoculou as sementes artificialmente e preparou suspensões de 10 diferentes fungicidas, nas quais as sementes permaneceram embebidas por diferentes períodos; realizou ainda tratamentos com ou sem a infiltração dos produtos. Obteve como melhores resultados os produtos thiram (185mg/200ml), por 2 horas, benomil (400mg/200ml) e captan (350mg/200ml) por 4 horas.

As primeiras recomendações de controle químico da doença na parte aérea foram citadas por FIGUEIREDO (1965), mediante o emprego de pulverizações com fungicidas cúpricos ou ditiocarbamatos. FLETCHER & PREECE (1966) enfatizaram que os fungicidas ditiocarbâmicos poderiam ter êxito no controle da podridão gomosa. KAGIWATA (1970) recomendou 4 aplicações em casa-de-vegetação com os produtos "Sanquinone", "Maneb-Dithane", triazina e griseofulvina. FLETCHER & SHARPE (1978), trabalhando com *Didymella lycopersici* em plantas de tomate recomendaram o pincelamento da pasta benomyl/actipron (óleo mineral adjuvante) na proporção de 1:1,5,

a qual impediu completamente o desenvolvimento das lesões.

DOW *et al.* (1978) estudando o efeito da temperatura de armazenagem de frutos de melancia e a aplicação de fungicidas no campo, concluíram que os frutos armazenados a 16°C e aqueles que receberam aplicações no campo com mancozeb e captafol foram os que mostraram menor podridão. VAN STEEKELENBURG (1978), avaliando culturas comerciais de pepino tratadas com diferentes fungicidas, obteve como melhores tratamentos, em ordem decrescente de eficiência, aplicações semanais de benomyl, chlorothalonil e triforine. Afirmou ainda que tais produtos deveriam ser aplicados alternadamente, para evitar o fenômeno de resistência dos isolados aos derivados de benzimidazole. Segundo PEREGRINE *et al.* (1984), os produtos benomyl e mancozeb aplicados semanalmente para o controle da antracnose da melancia mostraram-se eficientes no controle de *D. bryoniae*. BALA & FARZAN (1985) também recomendaram mancozeb e benomyl, além de chlorothalonil e oxicleto de cobre. Em trabalho recente, ZIV & ZITTER (1992) obtiveram resultados interessantes no controle de diversas doenças foliares de diferentes espécies de cucurbitáceas, entre elas *D. bryoniae* em melão, com o uso de polímeros formadores de filme e sais de bicarbonatos. O melhor resultado obtido foi o uso de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3 - 1% p/v) + SS (óleo Sun Spray -1% v/v) em tratamento preventivo 2 horas antes da inoculação. TSAY *et al.* (1992) estudaram a diferença de suscetibilidade entre algumas variedades de melão e efetuaram uma triagem dos melhores fungicidas para se controlar o cancro gomoso da haste, chegando à conclusão de que em casa-de-vegetação os produtos mais

eficientes foram flusilazole e pyrifenox, não atingindo, entretanto, elevada eficiência.

Como já havia previsto VAN STEEKELENBURG (1978), a aplicação contínua de benzimidazoles em culturas de cucurbitáceas acarretaria no surgimento de isolados resistentes ao produto. MALATHRAKIS & VAKALOUNAKIS (1983) constataram na Grécia, após apenas um ano de aplicações de benomyl em culturas de melão e pepino, o surgimento de isolados resistentes, os quais necessitavam de 716 ± 49 $\mu\text{g/ml}$ do i.a. em culturas "in vitro" para reduzir o crescimento micelial em 50%, enquanto que os isolados sensíveis, com apenas $1,2 \pm 0,34$ $\mu\text{g/ml}$ do i.a. tal fato já ocorria. VAN STEEKELENBURG (1987) relatou a primeira ocorrência na Holanda de isolados de *D. bryoniae* resistentes a benzimidazoles. Encontrou 17% dos isolados testados como sendo resistentes ao benomyl e nenhum deles resistentes ao vinclozolin (dicarboximida). Apontou ainda que não houve diferença no crescimento micelial entre os isolados resistentes e sensíveis, assim como na infectividade dos mesmos. Recomendou como alternativa no controle do patógeno, o uso de tolyfluanid, chlorothalonil e inibidores da biossíntese de ergosterol.

2.3 Controle Biológico

Uma alternativa com maiores chances de sucesso no controle de doenças de plantas se constitui na integração de diferentes métodos do que na utilização de um único método. A complexidade do agroecossistema requer uma abordagem multidisciplinar dos problemas a serem resolvidos. A utilização contínua e exclusiva, por

exemplo, de um fungicida específico para o controle de uma determinada doença, muito provavelmente levará ao desenvolvimento de linhagens resistentes do patógeno, colocando em risco a eficiência do controle (GHINI, 1991).

Analisando-se os resultados obtidos com o controle biológico chega-se à conclusão que, muitas vezes, somente um controle parcial da doença é atingido. Isso pode ser explicado pela constante dependência do controle biológico por diversos fatores bióticos e abióticos. Assim, o controle biológico, como única medida de controle, na maioria dos casos, não tem substituído outros métodos, entretanto, pode ser considerado como um importante complemento de outras medidas (HENIS & CHET, 1975).

COOK & BAKER (1983) definem controle biológico como sendo "a redução da soma do inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem". Os autores explicam que atividades determinantes de doenças envolvem crescimento, infectividade, virulência, agressividade e outras qualidades do patógeno, ou processos que determinam infecção, desenvolvimento de sintomas e reprodução.

Os mecanismos das interações antagonistas entre microorganismos patogênicos e antagonistas com a planta podem ser divididos em antibiose, competição, parasitismo, predação, hipovirulência e indução de defesa do hospedeiro (BOOLSALIS, 1964; BAKER & COOK, 1974; SCHROTH & HANCOCK, 1981; BLAKEMAN & FOKKEMA, 1982; COOK & BAKER, 1983; MEINHARDT, 1984; COOK, 1985).

Poucas áreas de pesquisa e educação dentro da patologia de plantas

tem atraído tamanho interesse durante os últimos 20-25 anos como o uso de microorganismos introduzidos para o controle biológico de patógenos de plantas. O intenso interesse científico no controle biológico de doenças de plantas é uma resposta, em parte, à crescente preocupação pública a respeito dos defensivos agrícolas. Entretanto, há uma necessidade igualmente grande ou ainda maior pelo controle biológico de patógenos que atualmente não são controlados ou parcialmente controlados. Nenhum controle químico prático ou econômico conseguiu ainda substituir *Agrobacterium radiobacter* estirpe K-84 no controle biológico da galha da coroa, assim como nenhum defensivo poderia necessariamente substituir bactérias ativas nucleadoras de gelo no controle dos danos causados por geadas. O controle biológico deve e pode ser justificado nos seus próprios méritos, não se esquecendo ainda da importância dos seus custos frente ao controle químico (COOK, 1993).

Na literatura, o número de trabalhos envolvendo as mais diferentes formas de controle biológico de doenças de plantas é muito extenso. O biocontrole do cancro da castanheira, causado por *Endothia parasitica*, é conseguido com inoculação de estirpes hipovirulentas do próprio patógeno, que por anastomose de hifas transformarão o patógeno virulento em hipovirulento; tal controle ocorre naturalmente na Itália e é artificialmente utilizado na França (ANAGNOSTAKIS, 1982). Segundo BLAKEMAN & FOKEMA (1982), diversas doenças foliares têm sido reduzidas significativamente (mais de 50%), quando pulverizações com esporos de fungos comuns do filoplano foram aplicadas, como no caso de *Alternaria*, *Cochliobolus*, *Septoria*, *Colletotrichum* e *Phoma*,

ou ainda, com esporos de hiperparasitas, como míldio do pepino (*Sphaerotheca fuliginea*) com esporos de *Ampelomyces quisqualis*, ou a ferrugem da folha do trigo (*Puccinia recondita*) com esporos de *Darluca filum*.

No caso de controle biológico de doenças de pós-colheita, WILSON & LAWRENCE (1985) apontam como exemplos, a redução significativa do bolor verde dos citros (*Penicillium digitatum*) que foi atingida pelo tratamento dos frutos com o antagonista *Trichoderma viride*; podridão de *Botrytis* do morango em pré ou pós-colheita foi reduzida por várias aplicações de esporos de *Trichoderma* nas flores ou nos frutos jovens.

MARX (1972) cita o biocontrole de patógenos radiculares pelo uso de micorrizas, alcançando consideráveis proteções em plântulas de pinheiro contra *Phytophthora cinnamomi*; plântulas de tomate contra *Fusarium oxysporum*; plantas de algodão contra murcha de *Verticillium* e nematóides; e plantas de soja contra *Phytophthora megasperma* e *Fusarium solani*.

O estudo de bactérias como agentes controladores de doenças é também muito intenso. O primeiro exemplo a ser lembrado será sempre o biocontrole da galha da coroa com *Agrobacterium radiobacter* estirpe K 84 , controlando *A. tumefaciens* em algumas frutíferas e ornamentais, sendo utilizado comercialmente com grande êxito (KERR, 1980). Segundo BROADBENT *et al.* (1971) a bacterização de sementes no tratamento contra patógenos radiculares, com suspensões aquosas, pastas, ou pó contendo *Bacillus subtilis* estirpe A-13 ou *Streptomyces* sp. tem protegido alguns cereais, como

o milho doce, e aumentado o rendimento dessas culturas. KLOEPPER & SCHROTH (1981) desenvolveram uma formulação em pó para estirpes de rizobactérias promotoras de crescimento de brotação de batatinha, misturando as bactérias com uma goma do tipo xanthana, seguindo-se a adição de talco, obtendo assim excelentes resultados.

LINDOW (1983) lembra ainda do biocontrole de geadas por bactérias nucleadoras de gelo, como espécies epífitas de *Pseudomonas syringae*, *P. fluorescens* e *Erwinia herbicola*, as quais protegem as plantas sensíveis às injúrias causadas pela geada.

AGRIOS (1988b), em seu capítulo "Controle de Doenças de Plantas", apresenta uma série de exemplos de controle biológico de doenças de plantas muito bem sucedidos.

BECKER & SCHWINN (1993), realizando uma revisão das publicações no jornal científico *Phytopathology* durante aqueles últimos cinco anos, perceberam que quase 80% dos artigos de controle biológico voltavam-se, de uma forma ou de outra, para o controle biológico de patógenos habitantes de solo. Tal fato reflete, entre outras coisas, a visão de que agentes de controle biológico são mais eficientes no solo do que no filoplano. Os autores apresentam ainda uma tabela com os produtos comerciais de biocontrole de patógenos de solo, os quais, entre outros, são: Norbac 84-C (*Agrobacterium radiobacter* estirpe 84) controlando *A. tumefaciens* em frutíferas e ornamentais, sendo registrado nos EUA; Quantum 4000 (*Bacillus subtilis*) controlando *Fusarium* e *Rhizoctonia* em amendoim, sendo registrado nos EUA; Kodjak (*Bacillus subtilis*) controlando "damping-off" em algodão, sendo registrado nos EUA; Conquer

(*Pseudomonas fluorescens*) controlando *Pseudomonas tolaasii* em congumelos, sendo registrado na Austrália; Polygandron (*Pythium oligandrum*) controlando *Pythium ultimum* em cana-de-açúcar, sendo registrado na Tchecoslováquia; além de outros poucos produtos, o que faz mostrar mais uma característica atrativa para o desenvolvimento comercial de agentes de controle biológico, já que o número de produtos competitivos é ainda muito pequeno.

Para o patossistema *D. bryoniae* e melão ou cucurbitáceas nenhum trabalho, que envolva a ação de agentes biológicos no controle do referido patógeno, foi encontrado até o momento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A condução dos trabalhos foi realizada nas dependências do Departamento de Fitopatologia/ESALQ-USP.

3.1 Obtenção dos Isolados

Os isolamentos foram efetuados a partir de plantas e frutos de melão ou de outras cucurbitáceas que mostrassem sintomas típicos da doença; para tanto foram isolados picnídios ou peritécios, primeiramente, em ágar-água e, posteriormente, após o desenvolvimento do micélio, a repicagem foi feita para meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). Um dos isolados foi fornecido pela micoteca da empresa Agroflora S.A.. Os isolados utilizados nos testes de patogenicidade podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1. Isolados de *Didymella bryoniae* utilizados nos testes de patogenicidade.

Data	Origem	Localidade	Código
06/04/93	haste de melão cv. CAC amarelo	Bragança Paulista-SP	AGF
15/06/93	haste de melancia	Piracicaba-SP	CLI-1
22/07/93	fruto de abobrinha Menininha	Espírito Santo do Pinhal-SP	EPI

3.2 Obtenção das Sementes de Melão

As sementes utilizadas em todos os experimentos foram fornecidas pela empresa Agroflora S.A. Utilizou-se a cultivar CAC Amarelo, sendo um lote já tratado com captan , e outro sem tratamento para ensaios os quais não o era conveniente.

3.3 Testes de Patogenicidade

Para se comprovar a patogenicidade dos isolados, as inoculações foram realizadas com suspensões de esporos produzidos em feijão azuki (FIGUEIREDO, 1972; PASCHOLATI, 1980), incubados durante 7 dias sob luz fluorescente, situada a 50 cm de distância, conferindo uma temperatura próxima a 24 °C, e pulverizadas sobre as folhas e hastes das plantas de melão, quando estas possuíam as duas primeiras folhas verdadeiras (ZAMBRANO-PÉREZ, 1972).

A concentração de inóculo dessas suspensões foi aferida em hemocitômetro, sendo padronizada a 10^5 esporos/ml.

Após a inoculação, as plantas foram incubadas durante 48 horas em câmara úmida, tentando se manter a temperatura ao redor de 24°C (SOWELL & POINTER, 1962).

A avaliação dos sintomas foi feita 5 a 15 dias após inoculação (ZAMBRANO-PÉREZ, 1972). Todos os isolados se mostraram patogênicos e produziram sintomas típicos da doença. Posteriormente, procedeu-se ao re-isolamento do patógeno.

O isolado AGF se comportou como o mais patogênico dentre aqueles

testados, chegando a causar a morte na maioria das plantas. Este isolado foi escolhido para se trabalhar nos ensaios subseqüentes

3.4 Teste de Concentração de Inóculo

Foi realizado um teste de concentração de inóculo para o isolado AGF, já que esse havia se mostrado muito patogênico na concentração de 10^5 esporos/ml em ensaios anteriores.

Os tratamentos utilizados foram: 10^3 , 10^4 e 10^5 esporos/ml.

A concentração das suspensões de esporos utilizadas foi aferida em hemocitômetro

A inoculação das plantas, com as duas primeiras folhas verdadeiras, se procedeu através da pulverização da suspensão de esporos até atingir o ponto de escorrimento. Após essa operação, as mesmas foram mantidas em câmara úmida por 48 horas com a temperatura ao redor de 24°C . Cada tratamento constou de três repetições, sendo cada parcela representada por um vaso com três plantas de melão.

A avaliação foi realizada, qualitativamente 5 a 15 dias após a inoculação, levando-se em consideração o aspecto visual das plantas como um todo.

3.5 Controle Químico

3.5.1 Sensibilidade "in vitro" de *D. bryoniae* a diferentes fungicidas

Foram testados 16 fungicidas quanto à sua fungitoxidez inerente ao patógeno em estudo. Optou-se pelo uso dos produtos já tradicionalmente recomendados para o controle da doença, além de diversos outros novos produtos sistêmicos.

Os fungicidas foram suspensos em água destilada estéril e adicionados ao meio de cultura BDA fundente, à 45-50°C, após autoclavagem, obtendo-se a concentração final de 100 µg/ml dos ingredientes ativos dos fungicidas. Os produtos utilizados, seus nomes comerciais e respectivos princípios ativos, podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2. Fungicidas utilizados no teste de sensibilidade “in vitro” de *D. bryoniae*

Ingrediente Ativo	Produto Comercial	Concentração
Benomyl	BENLATE 500	500g/kg
Tiofanato metílico	CERCOBIN 500 SC	500g/l
Dodine	VENTUROL	65% p/p
Iprodione	ROVRAL	500g/kg
Vinclozolin	RONILAN 500	500g/kg
Diniconazole	SPOTLESS	125g/kg
Oxadixyl	-	20% p/p
Procymidone	SUMILEX 500 PM	500g/kg
Propiconazole	TILT	250g/l
Captan	CAPTAN 500 PM	473g/kg
Mancozeb	DITHANE PM	800g/kg
Chlorothalonil	DACONIL BR	750g/kg
Himexazol	TACHIGAREN	700g/l
Fluazinan	FROWNCIDE	500g/kg
Procloraz	SPORTAK	450g/kg
Trifenil hidróxido de estanho	MERTIN 400	40% p/v

O isolado AGF de *D. bryoniae* foi previamente cultivado em BDA por 5-7 dias a 24°C, sob escuro, quando então, discos de micélio com 6 mm de diâmetro

retirados das bordas das colônias foram transferidos para os meios de cultura contendo os fungicidas. Após a incubação, sob as condições já referidas, por um período de 7 dias, foi feita a aferição perpendicular dos diâmetros das colônias em milímetros. A avaliação foi realizada determinando-se a porcentagem de inibição (% I) dos tratamentos em relação à testemunha, utilizando-se a fórmula:

$$\% I = \frac{\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento}}{\text{diâmetro da testemunha}} \times 100$$

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 repetições, sendo cada parcela representada por uma placa de Petri, resultando em um total de 17 tratamentos (16 fungicidas + testemunha). Para a análise estatística os dados foram transformados em $\text{arc sen} \sqrt{x/100}$.

Os produtos que mostraram melhor eficiência na concentração de 100 µg/ml foram submetidos a novos testes para as concentrações de 1, 10 e 100 µg/ml, a fim de se determinar a concentração necessária para se inibir em 50% o crescimento micelial (ED_{50}). Todos os tratamentos apresentaram de quatro repetições, sob um delineamento experimental inteiramente casualizado. Cada parcela foi representada por uma placa de Petri.

3.5.2 Sensibilidade " in vivo " de *D. bryoniae* a diferentes produtos químicos

Nesse ensaio foram utilizados os produtos que se mostraram como os mais eficientes no ensaio anterior (item 3.5.1), além da inclusão do produto tiofanato metílico + chlorothalonil, já anteriormente recomendado para o controle da doença (KIMATI *et al.*, 1986). Foram incluídos também mais duas misturas: bicarbonato de sódio (NaHCO_3) + óleo mineral (Natur'óleo - Arbore), conforme relatado por ZIV & ZITTER (1992), o qual havia se mostrado como altamente eficiente; e iprodione + óleo mineral (Natur'óleo), esperando-se assim, algum resultado positivo com a adição do óleo. As dosagens utilizadas foram aquelas recomendadas para o controle da doença à nível de campo. Os produtos comerciais, seus ingredientes ativos e as dosagens utilizadas podem ser visualizados na Tabela 3.

Tabela 3. Ingrediente ativo, produto comercial e dosagem utilizada.

Ingrediente Ativo	Produto Comercial	Dosagem (g ou ml/litro de água)
Propiconazole	TILT	500 ml/300
Iprodione	ROVRAL	150g/100
Vinclozolin	RONILAN 500	150 g/100
Tiofanato metílico + chlorothalonil	CERCONIL PM	200 g/100
Benomyl	BENLATE	70 g/100
Procymidone	SUMILEX 500 PM	150 g/100
Iprodione + óleo mineral	ROVRAL + NATUR' ÓLEO	150g/100 + 500 ml/100
NaHCO ₃ + óleo mineral *	sal de bicarbonato de sódio + NATUR' ÓLEO	500 g/100 + 500 ml/100

* a dosagem do óleo mineral para se comprovar o efeito protetor, com 48 horas de antecedência, foi de 1 litro/100 litros

Objetivando-se comprovar a ação preventiva, erradicante e curativa de cada produto (ou mistura) foram realizados três diferentes experimentos. Em todos eles, as plantas foram inoculadas, simultaneamente, no estágio de 3ª e 4ª folha verdadeira, com uma suspensão de 3×10^4 esporos/ml, calibrada em hemacitômetro, pulverizada sobre as mesmas.

Para todos os experimentos foram realizadas duas avaliações em épocas distintas, para melhor acompanhamento de desenvolvimento da doença. A primeira ocorreu 23 dias após a inoculação e, a segunda, 10 dias após a primeira, ou seja, 33 dias

após a inoculação; para tanto, utilizou-se da escala de notas elaborada por VAN STEEKELENBURG (1978) em plantas de pepino, adaptada para plantas de melão, acrescentando-se apenas um nível de notas, ou seja, 0 - folhas saudáveis; 1 - lesões afetando até 50% da área foliar; 2 - lesões ocupando mais do que 50% da área foliar; e 3 - folhas completamente necrosadas ou mortas. As notas foram atribuídas às 1ª e 2ª folhas, sendo o índice de doença correspondente à média da soma das duas notas. Tal escala de notas foi também utilizada para se avaliar a doença nas hastes das plantas, efetuando-se a devida adaptação, ou seja, 0 - haste saudável; 1 - lesões circundando até 50% da haste; 2 - lesões circundando mais do que 50% da haste; e 3 - haste completamente necrosada ou morta. A segunda avaliação das plantas inoculadas foi realizada apenas para as hastes das mesmas.

Para a análise estatística destes experimentos os dados foram transformados em $\sqrt{x + 1}$ e analisados pelo teste de Duncan.

3.5.2.1 Efeito protetor de diferentes produtos químicos sobre *D.*

***bryoniae*, inoculado em plantas de melão**

Para se comprovar o efeito protetor dos diferentes produtos químicos, anteriormente citados (tabela 3), foram realizadas pulverizações dos mesmos 48 e 24 horas antecedentes à inoculação.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 17 tratamentos (8 produtos x 2 épocas de inoculação + testemunha inoculada) e três

repetições, sendo cada parcela constituída por um vaso com três plantas.

3.5.2.2 Efeito erradicante de diferentes produtos químicos sobre *D. bryoniae*, inoculado sobre plantas de melão

Para se comprovar o efeito erradicante dos diferentes produtos químicos, anteriormente citados (Tabela 3), foram realizadas pulverizações dos mesmos 3 minutos antes da inoculação, tempo este suficiente para que os produtos secassem sobre a superfície das plantas.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 9 tratamentos (8 produtos + testemunha inoculada) e três repetições, sendo cada parcela constituída por um vaso com três plantas.

3.5.2.3 Efeito curativo de diferentes produtos químicos sobre *D. bryoniae*, inoculado sobre plantas de melão

Para se comprovar o efeito curativo dos diferentes produtos químicos, anteriormente citados (Tabela 3), foram realizadas pulverizações dos mesmos 24 e 48 horas após a inoculação.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 17 tratamentos (8 produtos x 2 épocas + testemunha inoculada) e três repetições, sendo cada parcela constituída de um vaso com três plantas.

3.5.2.4 Efeito " imunizante " de iprodione e benomyl sobre *D. bryoniae*, inoculado sobre plantas de melão

Objetivando-se tratar as plantas de uma forma diferente até agora testada, optou-se pelo uso dos fungicidas iprodione e benomyl aplicados na forma de regas ao solo, supondo-se a possibilidade de imunização das plantas de melão.

Os fungicidas do grupo dos benzimidazoles foram os primeiros com ação sistêmica conhecida a serem patenteados; dentre eles benomyl (DELP & KLÖPPING, 1968) tem sido o mais largamente utilizado devido ser a sua eficiência, de modo geral, superior às demais do mesmo grupo. Seu modo de ação sistêmica já é bem estudado, comprovando de forma clara seu movimento ascendente no interior das plantas, seguindo o movimento da via transpiratória (DAVIDSE & WAARD, 1984). Dessa forma, fez-se justificável o uso do mesmo no presente ensaio.

Os fungicidas do grupo das dicarboximidas, em especial o iprodione, têm sido relatados como fungicidas de contato sem características sistêmicas (MARTIN & WORTHING, 1977). Entretanto, CAYLEY & HIDE (1980) provaram que iprodione pode ser translocado pelas raízes de plantas de batata e prevenir sistemicamente infecções por *Phoma exigua* var. *foveata*. Dessa forma, fez-se justificável, também, o seu uso no presente ensaio.

Para tanto, quando as plantas possuíam a primeira folha verdadeira, sofreram uma rega com suspensões de 200 ml dos fungicidas em dosagens recomendadas comercialmente para a pulverização foliar.

A inoculação se deu 16 dias após a aplicação dos produtos no solo, utilizando-se uma suspensão de inóculo calibrada em hemocitômetro para 10^4 esporos/ml.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições, sendo cada parcela constituída por um vaso com três plantas de melão.

A avaliação foi realizada 15 dias após a inoculação, segundo a escala de notas descrita no item 3.5.2.

3.5.3 Sensibilidade de *D. bryoniae* inoculado em folhas destacadas, tratadas com diferentes fungicidas

Com o objetivo de minimizar o trabalho a nível de casa-de-vegetação e se valer das vantagens do uso de folhas destacadas, tal técnica foi utilizada procurando-se obter uma boa correlação desta última com a primeira, com vistas a facilitar estudos posteriores com novos produtos "in vivo".

Foi empregada a técnica de inoculação em folhas destacadas conforme PASCHOLATI (1980), utilizando-se plantas de melão conduzidas em casa-de-vegetação, cuja primeira folha foi cortada o mais próximo do caule. Após essa operação, as folhas foram levadas para o laboratório e seus pecíolos colocados em contato com água destilada, para que não perdessem a turgidez, aguardando seu posterior acondicionamento.

À técnica de acondicionamento das folhas procedeu-se modificação àquela originalmente descrita (PASCHOLATI, 1980), constando na deposição de duas

folhas de papel de filtro e pequeno volume de algodão, ambos embebidos em água destilada, estando o primeiro posicionado na tampa das placas e o segundo na ponta do pecíolo seccionado, mantendo assim alto teor de umidade no interior daquelas e turgescência adequada às folhas.

Foram utilizados os dois fungicidas que se mostraram mais eficientes nos ensaios realizados "in vivo" (item 3.5.2), comparando-se com o produto tiofanato metílico + chlorothalonil, tradicionalmente recomendado para o controle da doença. As dosagens utilizadas foram aquelas recomendadas à nível de campo. A inoculação foi realizada 3 minutos após as pulverizações dos mesmos, tempo suficiente para que as superfícies foliares secassem.

A inoculação foi feita com uma suspensão de esporos calibrada para 10^4 esporos/ml, pulverizada com atomizador De Vilbs na face superior de cada folha destacada.

O material inoculado foi mantido em câmara escura com temperatura controlada para 24°C , conforme descrito por PASCHOLATI (1980).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições, sendo cada parcela constituída por uma folha destacada acondicionada em uma placa de Petri. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Duncan, com transformações dos dados segundo $\sqrt{x + 1}$.

Cinco dias após a inoculação as folhas foram avaliadas segundo a escala de notas já referida no item 3.5.2.

3.6 Controle Biológico

3.6.1 Isolamento de bactérias antagônicas a *D. bryoniae*

Para o isolamento de bactérias antagônicas a *D. bryoniae* utilizou-se metodologia adaptada e apresentada por GHINI & KIMATI (1989), a qual consistiu de iscas para obtenção de isolados de *Trichoderma*, ou seja, sementes de trigo previamente autoclavadas foram colonizadas por *Botrytis cinerea* e distribuídas em placas de Petri contendo solo para o isolamento seletivo do antagonista. Sendo assim, no presente trabalho, sementes de feijão Azuki, após sofrerem autoclavagem, foram colonizadas por *D. bryoniae* durante 10 dias, funcionando desta forma como iscas de antagonistas, as quais foram incorporadas em amostras de diferentes tipos de solo. A coleta destas amostras foi realizada em diferentes localidades no interior do Campus da USP-Piracicaba, além de regiões circunvizinhas a este. Informações complementares quanto ao local e cultura agrícola dos solos coletados para obtenção dos antagonistas utilizados nesse estudo estão contidas na Tabela 4.

Tabela 4 . Local de coleta das amostras de solo e respectivas culturas agrícolas.

Local de Coleta	Cultura Agrícola
Departamento de Fitopatologia - ESALQ/USP	Trigo
Mata Ciliar do Rio Piracicamirim - ESALQ/USP	Bambú
Departamento de Agricultura - ESALQ/USP	Seringueira
Departamento de Horticultura - ESALQ/USP	Diversas
Rodovia Luiz de Queiroz - Piracicaba-SP	Cana-de-açúcar
Departamento de Agricultura - ESALQ/USP	Amendoim
Departamento de Genética -ESALQ/USP	Milho
Departamento de Zootecnia - ESALQ/USP	Forrageira
Departamento de Agricultura - ESALQ/USP	Café
Departamento de Agricultura - ESALQ/USP	Arroz de várzea

Amostras de solo de 15 g, em média, foram acondicionadas em placas de Petri e acrescidas de 10 ml de água destilada. Dez sementes colonizadas pelo patógeno foram distribuídas em cada placa e mantidas à temperatura ambiente por 48 horas. Posteriormente, as sementes foram retiradas das placas e lavadas em água destilada corrente, retirando assim o excesso de terra. Em seguida, as sementes foram imersas em recipientes contendo água destilada e, assim, aquecidas em banho-maria por 5 minutos à temperatura de $80 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Tal procedimento foi realizado objetivando-se eliminar todos os microorganismos não resistentes à referida temperatura, ou seja, procurou-se efetuar

um isolamento seletivo de espécies de bactérias do gênero *Bacillus*, a qual, por produzir estruturas de resistência (endosporos) consegue sobreviver a essas determinadas condições. Finalmente, após o banho-maria, cinco sementes/placa foram plaqueadas em meio BDA, sendo incubadas por 24 horas à temperatura de 28°C e, em seguida, aquelas colônias de bactérias que se formaram ao redor das sementes foram repicadas para novo meio BDA e assim isoladas.

3.6.2 Seleção das bactérias mais antagônicas

A seleção das bactérias mais antagônicas foi realizada em duas etapas, ambas valendo-se do método de culturas pareadas sob a forma de riscas sobre a superfície de meio de cultura adequado em placas de Petri (MARIANO, 1993). Em uma primeira fase, em posse de um grande número de isolados (50) foi utilizada a técnica de riscas com alça de platina contendo a bactéria num terço da placa contraposto a um disco de micélio do patógeno no terço oposto da placa. A avaliação foi feita de forma qualitativa, ou seja, existência ou não de halo inibitório, após 7 dias de incubação a 28°C sob escuro.

Em uma segunda fase, trabalhando com apenas 11 isolados, selecionados dentre os 50 anteriores, utilizou-se da técnica do funil, descrita anteriormente por LUZ (1993), por se considerar um método mais facilmente quantificável. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com 3 repetições, uma testemunha riscada com funil imerso em água estéril, sendo cada parcela constituída

por uma placa de Petri com as culturas pareadas. A avaliação foi feita segundo a porcentagem de inibição dos tratamentos em relação à testemunha (% I), medindo-se o diâmetro das colônias em milímetros, cujo cálculo foi realizado pela fórmula descrita no item 3.5.1, após 7 dias de incubação a 28°C sob escuro.

Os dados foram transformados em $\arcsin\sqrt{x/100}$ e analisados segundo o teste de Tukey.

3.7 Controle Químico x Controle Biológico

3.7.1 Tratamento de sementes

Dada a indisponibilidade de um lote de sementes de melão com elevado índice de infecção natural de *D. bryoniae*, a avaliação da potencialidade dos controles químico e biológico foi realizada mediante inoculação artificial das mesmas.

3.7.1.1 Inoculação das sementes de melão e transmissibilidade

O método de inoculação utilizado foi o de embebição de um determinado número de sementes, previamente desinfetadas em uma solução de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) e água (3:1), em suspensão de esporos, seguido da sua exposição ao ar para secagem.

Com o objetivo de se determinar a melhor concentração de inóculo associada ao melhor tempo de embebição, para se alcançar um alto índice de infecção, foi realizado experimento variando-se a concentração da suspensão e tempo de

embebição das sementes.

O experimento constou, portanto, dos seguintes tratamentos:

- a. 10^3 esporos/ml x 30 minutos de embebição
- b. 10^3 esporos/ml x 120 minutos de embebição
- c. 10^5 esporos/ml x 30 minutos de embebição
- d. 10^5 esporos/ml x 120 minutos de embebição

A fim de se verificar a incidência da doença nas sementes, conforme o tratamento e, a possível transmissibilidade do patógeno pelo método de inoculação utilizado, cada tratamento foi composto por 250 sementes, sendo 200 delas plaqueadas em papel de filtro (50 sementes/repetição) para avaliação da incidência na semente 7 dias após incubação (LEE *et al.*, 1984;) e, 50 delas semeadas em 5 vasos (10 sementes/vaso), para se verificar o desenvolvimento da doença nas plantas, as quais foram mantidas por 7 dias em câmara úmida. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado para ambos experimentos, com 4 repetições, para o experimento em laboratório e 5 repetições para o de transmissibilidade. Cada parcela foi constituída por uma placa de Petri com papel de filtro ou um vaso com 10 plantas, conforme o caso, respectivamente.

3.7.1.2 Controle químico x controle biológico

Para estudos comparativos sobre o efeito do controle químico x controle biológico avaliou-se o efeito dos fungicidas que se mostraram mais promissores, citados no item 3.5 (além do produto tiofanato metílico + chlorothalonil, tradicionalmente já recomendado para o controle da doença) com os antagonistas selecionados no item 3.6.2.

Todos os fungicidas utilizados neste experimento foram de formulação pó molhável, sendo, assim necessária, a adição de água para se aumentar a aderência dos mesmos às sementes. Foram utilizados 5ml de água destilada/kg de semente. Os fungicidas e concentrações por kg de semente utilizados foram: iprodione (2,0 g), benomyl (1,0 g) e tiofanato metílico + chlorothalonil (2,0 g).

O preparo da cultura dos antagonistas foi realizado conforme descrito por UTKHEDE & RAHE (1980), ou seja, os isolados de bactérias selecionados cresceram em erlenmeyers de 250 ml contendo 100 ml de caldo de batata-dextrose e foram incubados à temperatura e iluminação ambiente, sob agitação contínua, por um período de 6 dias. As sementes previamente inoculadas com *D. bryoniae* (10^5 esporos/ml x 30 minutos) foram então imersas nesta cultura de bactérias por 5 minutos, sendo, posteriormente, secas ao ar livre.

O experimento consistiu-se de 7 tratamentos (3 fungicidas + 2 agentes de controle biológico + testemunha inoculada + testemunha inoculada tratada com caldo de batata-dextrose estéril), cada qual composto por 200 sementes (50 sementes/repetição), em delineamento experimental inteiramente casualizado. O método de detecção utilizado

foi o de papel de filtro, com avaliação 7 dias após plaqueamento, sob condições de 12 horas de luz fluorescente e 12 horas de escuro, a 24° C.

Para a análise estatística os dados da porcentagem de incidência foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{x/100}$, analisados pelo teste de Tukey.

3.7.2 Efeito do fungicida iprodione e agentes de controle

biológico sobre *D. bryoniae* inoculado em plantas de melão

Por ter se destacado entre os melhores tratamentos fungicidas (item 3.5), o produto iprodione foi eleito como padrão comparativo para se avaliar a eficiência dos agentes de controle biológico.

Tanto o fungicida como as culturas de bactérias foram pulverizados sobre as plantas de melão 3 minutos antes da inoculação, tempo este suficiente para que suas superfícies estivessem secas.

A dosagem do fungicida utilizado foi correspondente a 150g/100 litros de água, do produto comercial, enquanto as culturas de bactérias foram pulverizadas na forma de caldo de bactérias-batata-dextrose, conforme descrito no item 3.7.1.2.

As plantas foram inoculadas no estágio de 3ª e 4ª folha verdadeira, com uma suspensão de esporos de *D. bryoniae* a 10^4 esporos/ml, sendo mantidas, após inoculação, em câmara úmida por 48 horas.

As plantas foram avaliadas 15 dias após inoculação segundo a escala de notas descrita no item 3.5.2, tanto para as folhas como para a haste.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 4 tratamentos (testemunha inoculada + 2 agentes de controle biológico + iprodione) e 3 repetições, sendo cada parcela composta por um vaso com 3 plantas. Para a análise estatística os dados foram transformados em $\sqrt{x + 1}$, e analisados segundo o teste de Tukey.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste de Concentração de Inóculo

Todas as plantas inoculadas na concentração de 10^5 esporos/ml exibiram sintomas de morte a partir do quinto dia após a inoculação, sendo assim considerada uma concentração muito elevada para se efetuar algum teste de agentes controladores ou fungicidas no controle da doença.

Apenas uma planta, dentre as 9 inoculadas na concentração de 10^3 esporos/ml, mostrou sintomas da doença, sendo assim, tal concentração foi considerada excessivamente baixa para ser utilizada no presente trabalho. Por outro lado, todas as plantas inoculadas na concentração de 10^4 esporos/ml mostraram sintomas típicos da doença, exibindo diferentes graus de severidade, sendo assim, tal concentração foi adotada como padrão para as futuras inoculações.

4.2 Controle Químico

4.2.1 Sensibilidade " in vitro " de *D. bryoniae* a diferentes fungicidas

A porcentagem de inibição dos 16 fungicidas testados "in vitro" a 100 µg/ml pode ser visualizada na tabela 5.

Tabela 5. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *D. bryoniae* "in vitro" a diferentes fungicidas na concentração de 100 µg/ml

Ingrediente Ativo	% Inibição
Benomyl	100,0 ⁽¹⁾ a ⁽²⁾
Iprodione	100,0 a
Propiconazole	100,0 a
Diniconazole	97,5 a
Vinclozolin	97,3 a
Prochloraz	96,2 a
Hymexazol	93,7 a
Procymidone	93,7 a
Frownicide	88,0 a
Trifenil hidróxido de estanho	85,2 a
Captan	66,3 b
Tiofanato metílico	63,9 b
Dodine	52,1 bc
Chlorothalonil	50,2 bc
Mancozeb	41,7 cd
Oxadixyl	28,0 e

(1) média de 4 repetições aos 7 dias de incubação.

(2) médias seguidas pela mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Pela análise dos dados observa-se que somente os ingredientes ativos captan, tiofanato metílico, dodine, chlorothalonil, mancozeb e oxadixyl diferiram estatisticamente das maiores porcentagens de inibição alcançadas por benomyl, iprodione e propiconazole (100%), situando-se os demais no mesmo nível estatístico destes últimos.

Pelo teste de sensibilidade "in vitro" a diferentes concentrações foi determinada a ED_{50} para os seguintes fungicidas apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Valores do ED_{50} de vários fungicidas quanto a inibição do crescimento micelial de *D. bryoniae* sob condições "in vitro".

Ingrediente Ativo	ED_{50} dos fungicidas ($\mu\text{g/ml}$)
Benomyl	1 - 10
Iprodione	< 1
Propiconazole	< 1
Vinclozolin	< 1
Procymidone	< 1

* Avaliação das colônias aos 7 dias de incubação.

Os valores apresentados são baseados na porcentagem de inibição em relação à testemunha.

Analisando-se a tabela 6 pode-se notar que em baixas concentrações "in vitro" o fungicida benomyl é menos eficiente do que os demais produtos testados, ou seja, seu ED_{50} é maior (1 - 10 $\mu\text{g/ml}$) do que o ED_{50} de iprodione, propiconazole, vinclozolin e procymidone (< 1 $\mu\text{g/ml}$); enquanto que a 100 $\mu\text{g/ml}$ benomyl inibiu em 100% o crescimento micelial, vinclozolin e procymidone inibiram 97,3 e 93,7%,

respectivamente (Tabela 5), embora ambos não tenham diferido estatisticamente do primeiro. Tal resposta pode ser atribuída à uma característica inerente ao modo de ação dos produtos. VAN STEEKELENBURG (1978) obteve resultados semelhantes ao avaliar diversos fungicidas quanto à sua inibição "in vitro" para *D. bryoniae*, ou seja, dentre os produtos avaliados verificou, também, que o ED₅₀ para benomyl situava-se entre 1 e 10 µg/ml.

4.2.2 Sensibilidade " in vivo " de *D. bryoniae* a diferentes produtos químicos

Para a avaliação das plantas inoculadas foi utilizada uma escala de notas elaborada tanto para as folhas como para as hastes (item 3.5.2). A escala de notas para a avaliação da doença nas folhas foi utilizada em várias pesquisas (VAN STEEKELENBURG, 1978, 1981, 1985a,b; BERGSTRON *et al.*, 1982; LESKI, 1984; NORTON & COSPER, 1989; ARNY & ROWE, 1991). Entretanto, a avaliação da doença nas hastes nem sempre é realizada, pois a ocorrência da mesma não é tão frequente e importante nos países em que o patógeno é mais intensamente estudado (Holanda e EUA), nos quais a doença se constitui um sério problema para a podridão dos frutos. Nas condições do Brasil, *D. bryoniae* causa seus maiores danos nas hastes das plantas de cucurbitáceas e, até hoje, existe na literatura apenas um trabalho com a cultura do melão, ainda não publicado na íntegra (DUSI *et al.*, 1993), que cita uma escala de notas para este tipo de avaliação, a qual varia de 0 a 4 (0 - ausência de sintomas; 4 -

necrose total do colo da planta). Sendo assim, no presente trabalho foi elaborado uma escala de notas para avaliação da doença nas hastes, que pode ser visualizada na Figura 1.

Figura 1.

Escala de notas (0-3) para avaliação da severidade de *D. bryoniae* em hastes de plantas de melão.

0 - haste sadia

1 - lesões circundando até 50% da superfície da haste

2 - lesões circundando mais do que 50% da superfície da haste

3 - haste completamente necrosada ou morta

4.2.2.1 Efeito protetor de diferentes produtos químicos sobre *D. bryoniae*, inoculado em plantas de melão

A avaliação do efeito protetor de diferentes produtos químicos sobre *D. bryoniae* foi realizada segundo a escala de notas descrita no item 3.5.2 e ilustrada, para a avaliação na haste, na Figura 1. A média das notas atribuídas às folhas na primeira avaliação, com pulverizações 48 e 24 horas antecedentes à inoculação é apresentada na Tabela 7.

Ao analisar a tabela 7, focalizando-se inicialmente o efeito protetor dos produtos aplicados com 48 horas de antecedência à inoculação, verifica-se que houve diferença significativa entre alguns fungicidas e a testemunha. O fungicida benomyl mostrou-se como o mais eficiente, propiciando a maior redução do índice de doença entre os produtos testados. Os fungicidas iprodione e propiconazole também diferiram da testemunha, entretanto, este último ocasionou um efeito hormonal sobre as plantas, diminuindo seu porte e deixando as folhas com cor verde mais intensa e textura coriácea. Os demais fungicidas avaliados embora não tenham diferido da testemunha, mostraram uma tendência de controle, já que numericamente apresentaram índices de doença inferiores à testemunha.

Tratando-se agora do efeito protetor dos produtos aplicados com 24 horas de antecedência à inoculação, verifica-se que também houve diferença significativa entre alguns fungicidas e a testemunha. Porém, a ordem de eficiência dos produtos se alterou em parte, quando comparada com o tratamento 48 horas antecedentes à inoculação.

Tabela 7. Efeito protetor de diferentes produtos químicos, isolados ou em combinação, sobre *D. bryoniae* em folhas de plantas de melão, aplicados 48 e 24 horas antecedentes à inoculação e avaliado 23 dias após a mesma.

Ingrediente Ativo	Concentração i.a. (µg/ml)	Média das notas ⁽¹⁾	
		48 horas	24 horas
Testemunha	0	2,38 a A ⁽²⁾	2,38 a A
Chlorothalonil + tiofanato metílico	1.000 400	1,61 ab. A	1,26 bc A
Procymidone	750	1,60 ab A	1,65 abc A
Vinclozolin	750	1,58 ab A	1,75 ab A
Propiconazole	417	1,18 bc A	1,93 ab A
Iprodione	750	1,09 bc A	0,82 c A
Benomyl	350	0,64 c A	1,22 bc A
Iprodione + óleo mineral	750 5.000	- ⁽³⁾	- ⁽³⁾
NaHCO ₃ + óleo mineral	5.000 10.000/5.000 ⁽⁴⁾	- ⁽³⁾	1,65 abc

(1) médias originais das notas atribuídas às 1ª e 2ª folhas, obtidas de 3 repetições.

(2) médias seguidas pela mesma letra (minúscula na coluna e maiúscula na linha) não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade (C.V.% dos dados transformados = 9,943).

(3) não foram atribuídas notas a estes tratamentos pois as plantas mostraram sintomas de fitotoxidez.

(4) 10.000 µg/ml de óleo mineral aplicados em 48 horas de antecedência e 5.000 µg/ml de óleo mineral aplicados em 24 horas de antecedência.

O fungicida iprodione mostrou-se como o mais eficiente, reduzindo bastante o índice de doença e, em termos de eficiência, logo abaixo deste se encontrou o benomyl e o chlorothalonil + tiofanato metílico, ambos diferindo da testemunha. O fungicida propiconazole apresentou mais uma vez os efeitos hormonais anteriormente citados.

VAN STEEKELENBURG (1978) avaliando os efeitos protetores e curativos de diversos fungicidas sobre plantas jovens de pepino inoculadas com *D. bryoniae* conseguiu o melhor controle com o fungicida benomyl, para as concentrações de 250 e 500 µg/ml, tanto para o efeito protetor 24 horas antecedentes à inoculação, como para o efeito curativo 24 horas posteriores à inoculação. O autor atribuiu os bons resultados com benomyl ao seu particular modo de ação e alta estabilidade de seu princípio ativo (metil -benzimidazol-carbamato - MBC).

Na literatura está presente uma série de trabalhos que comprovam esse efeito protetor do fungicida benomyl em diferentes relações patógeno-hospedeiro. RODRIGUES *et al.* (1987) conseguiram um efeito protetor de pelo menos 15 dias antes da inoculação de *Isariopsis griseola* em feijoeiro; GOES (1986) conseguiu um efeito protetor de 7 dias para mudas de abacaxi inoculadas com *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. Quanto ao fungicida iprodione alguns trabalhos também relatam sua capacidade protetora, como aquele realizado por VAN STEEKELENBURG (1988) onde obteve o melhor controle preventivo 24 horas antecedentes à inoculação de *D. lycopersici* em hastes de tomate. Resultados excelentes de controle preventivo são também citados

por KHARBANDA (1992) no controle de *Leptosphaeria maculans* em canola com aplicações foliares 4 dias antes da inoculação e, também, por ZITTER (1992) mediante o uso preventivo de iprodione no controle de *Ulocladium cucurbitae* em plantas de pepino.

Os tratamentos com a presença de óleo mineral mostraram, em geral, sintomas de fitotoxidez. Para a mistura bicarbonato de sódio (5000 µg/ml) + óleo mineral (10.000 µg/ml) os sintomas foram aparentes e caracterizados pela formação de manchas necróticas no limbo foliar; com a redução da concentração do óleo mineral para 5.000 µg/ml na mistura, tais sintomas não foram observados, permitindo assim uma avaliação da doença, a qual manteve-se em índice elevado, não diferindo estatisticamente da testemunha. Para a mistura iprodione (750 µg/ml) + óleo mineral (5.000 µg/ml) os sintomas de fitotoxidez foram típicos, mesmo a concentração de óleo não sendo tão elevada quanto para a primeira mistura citada. Quando se utilizou iprodione (750 µg/ml) isoladamente, não se verificou qualquer sintoma de fitotoxidez, admitindo assim, a possível ocorrência de um efeito sinérgico do fungicida com o óleo, propiciando, assim, tais problemas de fitotoxidez. Esses resultados vão em desacordo com aqueles encontrados por ZIV & ZITTER (1992), que utilizaram 1% de sais de bicarbonato (sódio, amônia e potássio) + 1% de óleo mineral (destilado de petróleo refinado) e obtiveram excelentes resultados no controle de algumas manchas foliares de cucurbitáceas, inclusive de *D. bryoniae*, não mencionando qualquer tipo de sintoma de fitotoxidez.

Comparando-se a eficiência dos produtos aplicados, em diferentes

intervalos de tempo, em relação ao momento da inoculação, pode-se notar que para os mesmos produtos não houve diferença significativa estatisticamente entre os tratamentos de 48 e 24 horas, ou seja, a eficiência de controle na aplicação dos fungicidas de forma protetora é a mesma 48 ou 24 horas antecedentes à inoculação. Para os produtos que mais se destacaram no controle da doença, pode-se dizer que o benomyl mostrou uma leve superioridade em eficiência quando aplicado 48 horas antecedentes à inoculação, enquanto que o iprodione mostrou uma leve superioridade em eficiência quando aplicado 24 horas antecedentes à inoculação.

A média das notas atribuídas às hastes na primeira avaliação 48 e 24 horas antecedentes à inoculação é apresentada na Tabela 8.

Pela análise da tabela 8 percebe-se que todos os fungicidas (excetuando-se as misturas com óleo), aplicados 48 ou 24 horas antecedentes à inoculação, diferiram estatisticamente da testemunha, não apresentando, entretanto, diferenças entre si. Porém, não se pode dizer que os produtos tenham apresentado boa eficiência de controle, pois o índice de doença verificado no tratamento correspondente à testemunha inoculada não foi elevado (1,18). Devido a este fato, optou-se por uma segunda avaliação de doença 10 dias posteriores, uma vez que o desenvolvimento da mesma nas hastes é mais lento do que nas folhas.

Evidentemente não houve diferenças na eficiência de controle entre os mesmos produtos em tratamentos de 48 e 24 horas, pelos próprios motivos já anteriormente citados.

Tabela 8. Efeito protetor de diferentes produtos químicos, isolados ou em combinação, sobre *D. bryoniae* em hastes de plantas de melão, aplicados 48 e 24 horas antecedentes à inoculação e avaliado 23 dias após a mesma.

Ingrediente Ativo	Concentração i.a. (µg/ml)	Média das notas ⁽¹⁾	
		48 horas	24 horas
Testemunha	0	1,18 a A ⁽²⁾	1,18 a A
NaHCO ₃ + óleo mineral	5.000 10.000/5.000 ⁽⁴⁾	- ⁽³⁾	0,72 a A
Vinclozolin	750	0,21 b A	0,00 b A
Chlorothalonil + tiofanato metílico	1.000 400	0,00 b A	0,00 b A
Procymidone	750	0,00 b A	0,10 b A
Propiconazole	417	0,00 b A	0,00 b A
Iprodione	750	0,00 b A	0,00 b A
Benomyl	350	0,00 b A	0,00 b A

(1) médias originais das notas atribuídas às hastes, obtidas de 3 repetições.

(2) médias seguidas pela mesma letra (minúscula na coluna e maiúscula na linha) não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade (C.V.% dos dados transformados = 9,912).

(3) não foram atribuídas notas a este tratamento pois as plantas mostraram sintomas de fitotoxidez.

(4) 10.000 µg/ml de óleo mineral aplicados em 48 horas de antecedência e 5.000µg/ml de óleo mineral aplicados em 24 horas de antecedência.

A média das notas atribuídas às hastes na segunda avaliação, com pulverizações 48 e 24 horas antecedentes à inoculação é apresentada na Tabela 9.

Tabela 9. Efeito protetor de diferentes produtos químicos, isolados ou em combinação, sobre *D. bryoniae* em hastes de plantas de melão, aplicados 48 e 24 horas antecedentes à inoculação e avaliado 33 dias após a mesma.

Ingrediente Ativo	Concentração i.a. (µg/ml)	Média das notas ⁽¹⁾	
		48 horas	24 horas
Testemunha	0	1,76 a A ⁽²⁾	1,76 a A
NaHCO ₃ + óleo mineral	5.000 10.000/5.000 ⁽⁴⁾	- ⁽³⁾	1,40 a A
Propiconazole	417	0,44 bc A	0,00 b A
Vinclozolin	750	0,41 bc A	0,20 b A
Benomyl	350	0,21 c A	0,44 b A
Chlorothalonil + tiofanato metílico	1.000 400	0,10 c A	0,32 b A
Procymidone	750	0,10 c A	0,44 b A
Iprodione	750	0,10 c A	0,32 b A

(1) médias originais das notas atribuídas às hastes, obtidas de 3 repetições.

(2) médias seguidas pela mesma letra (minúscula na coluna e maiúscula na linha) não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade (C.V.% dos dados transformados = 13,245).

(3) não foram atribuídas notas a este tratamento pois as plantas mostraram sintomas de fitotoxidez.

(4) 10.000 µg/ml de óleo mineral aplicados com 48 horas de antecedência e 5.000µg/ml de óleo mineral aplicados com 24 horas de antecedência.

Pelos dados apresentados na tabela acima nota-se que houve realmente um incremento na quantidade de doença, quando verifica-se que o índice de doença da

testemunha variou de 1.18 para 1.76 no intervalo de 10 dias, entre as duas avaliações. Variações significativas do nível de doença podem também ser verificadas nos demais tratamentos. Na avaliação dos produtos aplicados com 48 horas de antecedência à inoculação, observa-se que houve uma diferença significativa entre os tratamentos, destacando-se os produtos benomyl, chlorothalonil + tiofanato metílico, procymidone e iprodione, que embora não tenham diferido estatisticamente entre si foram diferentes da testemunha. A mistura NaHCO_3 + óleo mineral mostrou mais uma vez efeito fitotóxico, provavelmente devido a alta concentração de óleo (10.000 $\mu\text{g/ml}$).

Na avaliação dos produtos aplicados com 24 horas de antecedência à inoculação, verifica-se que todos os produtos mostraram igual desempenho, não diferindo estatisticamente entre si, mas sim da testemunha, com exceção da mistura NaHCO_3 + óleo mineral, que mostrou índice de doença similar à testemunha, não diferindo desta, e não apresentando sintomas de fitotoxidez, provavelmente devido a menor concentração de óleo na mistura (5.000 $\mu\text{g/ml}$).

Não houve diferença estatística entre as aplicações dos produtos em diferentes épocas de aplicação, ou seja, o nível de eficiência foi o mesmo, para cada produto, tanto aplicado 48 como 24 horas antecedentes à inoculação.

O desenvolvimento da doença nas hastes segundo as duas épocas avaliadas, em aplicações preventivas, pode ser melhor visualizado nas Figuras 2 e 3.

Figura 2. Desenvolvimento de *D. bryoniae* em haste de melão aos 23 e 33 dias após a inoculação, submetida à aplicação preventiva de fungicidas com 48 horas antecedentes à inoculação.

Figura 3. Desenvolvimento de *D. bryoniae* em haste de melão aos 23 e 33 dias após a inoculação, submetida à aplicação preventiva de fungicidas com 24 horas antecedentes à inoculação.

Pelos gráficos apresentados nas Figuras 2 e 3, nota-se claramente que o nível de doença da testemunha à época da primeira avaliação, mesmo diferindo dos demais tratamentos, estava ainda muito baixo e insuficiente para melhor separar os produtos segundo sua eficiência. Com a realização da segunda avaliação nota-se que a testemunha teve um índice de doença mais elevado, e os tratamentos mostraram diferenças significativas entre si, tanto para os tratamentos de 48 e 24 horas antecedentes à inoculação. A análise dos referidos dados justificou plenamente a realização da segunda avaliação, aos 33 dias após inoculação.

4.2.2.2 Efeito erradicante de diferentes produtos químicos sobre *D. bryoniae*, inoculado em plantas de melão

A avaliação do efeito erradicante dos diferentes produtos químicos sobre *D. bryoniae* foi realizada segundo as escala de notas citada no item 3.5.1 e ilustrada para a haste no item 4.2.2.. A média das notas atribuídas às folhas na avaliação aos 23 dias, com pulverizações simultâneas à inoculação é apresentada na Tabela 10.

Analisando-se a tabela 10, percebe-se que os produtos benomyl, NaHCO_3 + óleo mineral, iprodione e procymidone foram aqueles que mostraram melhor efeito erradicante sobre o patógeno, diferindo estatisticamente da testemunha, e não diferindo entre si. Na avaliação desses resultados aquele que mais surpreende é a boa atuação do bicarbonato de sódio + óleo mineral, o qual nos ensaios para se determinar o efeito protetor se comportou de maneira similar à testemunha.

Tabela 10. Efeito erradicante de diferentes produtos químicos, isolados ou em combinação, sobre *D. bryoniae* em folhas de plantas de melão, avaliado 23 dias após a inoculação.

Ingrediente Ativo	Concentração i.a. (µg/ml)	Média das notas ⁽¹⁾
Testemunha	0	2,39 a ⁽²⁾
Propiconazole	417	1,44 ab
Chlorothalonil + tiofanato metílico	1.000 400	1,43 ab
Vinclozolin	750	1,38 ab
Benomyl	350	1,21 b
NaHCO ₃ + óleo mineral	5.000 5.000	1,16 b
Iprodione	750	1,03 b
Procymidone	750	0,85 b

(1) médias originais das notas atribuídas às 1ª e 2ª folhas, obtidas de 3 repetições.

(2) médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade (C.V.% dos dados transformados = 11,226).

Pode-se notar que os produtos que vêm se destacando pelo sua eficiência protetora continuam mostrando-se como bons produtos erradicantes, como é o caso dos fungicidas iprodione e benomyl.

A média das notas atribuídas às hastes na avaliação aos 23 e 33 dias, com pulverizações simultâneas à inoculação, é apresentada na Tabela 11.

Tabela 11. Efeito erradicante de diferentes produtos químicos, isolados ou em combinação, sobre *D. bryoniae* em hastes de plantas de melão, avaliado 23 e 33 dias após a inoculação.

Ingrediente Ativo	Concentração i.a. (µg/ml)	Média das notas ⁽¹⁾	
		23 dias	33 dias
Testemunha	0	1,18 a ⁽²⁾	1,76 a
NaHCO ₃ + óleo mineral	5.000 5.000	0,32 b	0,43 b
Benomyl	350	0,10 b	0,29 b
Chlorothalonil + tiofanato metílico	1.000 400	0,10 b	0,21 b
Vinclozolin	750	0,00 b	0,21 b
Propiconazole	417	0,00 b	0,10 b
Procymidone	750	0,00 b	0,10 b
Iprodione	750	0,00 b	0,10 b

(1) médias originais das notas atribuídas às hastes, obtidas de 3 repetições.

(2) médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade (C.V.% dos dados transformados = 9,992, para avaliação aos 23 dias e C.V.% dos dados transformados = 11,591, para avaliação aos 33 dias).

Ao se analisar a Tabela 11, verifica-se que houve um incremento na quantidade de doença entre as avaliações realizadas aos 23 e 33 dias para todos os tratamentos. Observa-se que todos tratamentos diferiram estatisticamente da testemunha, e não diferiram entre si e, portanto, demonstrando mesmo nível de eficiência quanto ao seu poder erradicante no desenvolvimento da doença na haste.

A eficácia da ação erradicante dos fungicidas que melhor se destacaram

neste ensaio demonstrou a efetividade fungitóxica desses produtos, atuando possivelmente na germinação dos conídios deste fungo. Entretanto, não há trabalhos na literatura que mostrem esse tipo de estudo para o patógeno-hospedeiro em estudo.

4.2.2.3 Efeito curativo de diferentes produtos químicos sobre *D. bryoniae*, inoculado em plantas de melão

A avaliação do efeito curativo dos diferentes produtos químicos sobre *D. bryoniae* foi realizada segundo a escala de notas citada no item 3.5.1 e ilustrada para haste no item 4.2.2.. A média das notas atribuídas às folhas na avaliação aos 23 dias, com pulverizações 24 e 48 horas após a inoculação é apresentada na Tabela 12.

Tabela 12. Efeito curativo de diferentes produtos químicos, isolados ou em combinação, sobre *D. bryoniae* em folhas de plantas de melão, aplicados 24 e 48 horas posteriores à inoculação e avaliado 23 dias após a mesma.

Ingrediente Ativo	Concentração i.a. (µg/ml)	Média das notas ⁽¹⁾	
		24 horas	48 horas
Testemunha	0	2,38 a A ⁽²⁾	2,38 a A
Procymidone	750	2,11 ab A	1,56 ab A
NaHCO ₃ + óleo mineral	5.000 5.000	1,94 ab A	2,11 ab A
Benomyl	350	1,68 ab A	1,64 ab A
Iprodione	750	1,66 ab A	1,47 b A
Chlorothalonil + tiofanato metílico	1.000 400	1,65 ab A	1,72 ab A
Propiconazole	417	1,38 b A	1,71 ab A
Vinclozolin	750	1,36 b A	1,49 b A

(1) médias originais das notas atribuídas às 1ª e 2ª folhas, obtidas de 3 repetições.

(2) médias seguidas pela mesma letra (minúscula na coluna e maiúscula na linha) não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade (C.V.% dos dados transformados = 8,559).

Analisando-se a Tabela 12 verifica-se que, nas aplicações 24 horas posteriores à inoculação, somente os fungicidas propiconazole e vinclozolin mostraram eficiência que diferiu estatisticamente da testemunha, enquanto os demais produtos comportaram-se de forma semelhante à mesma. Nas aplicações 48 horas posteriores à inoculação, os fungicidas que mais se destacaram foram apenas iprodione e vinclozolin,

diferindo estatisticamente da testemunha.

Como o fungicida vinclozolin diferiu estatisticamente da testemunha em ambas épocas de aplicação, parece que este produto confirmou sua eficiência curativa para o patógeno em estudo. Entretanto, para *D. bryoniae* nenhum trabalho foi feito nesse sentido até o momento.

Com relação à média das notas atribuídas às hastes na primeira avaliação, considerou-se dispensável a sua apresentação, já que se verificou, mais uma vez, que a avaliação aos 23 dias após inoculação foi ainda muito cedo para o desenvolvimento da doença na haste, para as condições deste ensaio.

A média das notas atribuídas às hastes na segunda avaliação 24 e 48 horas após a inoculação é apresentada na Tabela 13.

Tabela 13. Efeito curativo de diferentes produtos químicos, isolados ou em combinação, sobre *D. bryoniae* em hastes de plantas de melão, aplicados 24 e 48 horas posteriores à inoculação e avaliado 33 dias após a mesma.

Ingrediente Ativo	Concentração i.a. (µg/ml)	Média das notas ⁽¹⁾	
		24 horas	48 horas
Testemunha	0	1,76 a A ⁽²⁾	1,76 a A
Iprodione	750	0,98 ab A	0,96 abc A
Chlorothalonil + tiofanato metílico	1.000 400	0,88 abc A	0,90 abc A
Procymidone	750	0,77 abcd A	1,50 a A
Vinclozolin	750	0,77 abcd A	0,55 bcd A
Benomyl	350	0,69 abcd A	1,28 ab A
NaHCO ₃ + óleo mineral	5.000 5.000	0,32 bcd A	- ⁽³⁾
Propiconazole	417	0,00 d A	0,00 d A

(1) médias originais das notas atribuídas às hastes, obtidas de 3 repetições.

(2) médias seguidas pela mesma letra (minúscula na coluna e maiúscula na linha) não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade (C.V.% dos dados transformados = 13,941).

(3) avaliação impossibilitada.

Pela análise da Tabela 13 percebe-se que apenas a mistura bicarbonato de sódio + óleo e o produto propiconazole diferiram estatisticamente da testemunha, para aplicação 24 horas posterior à inoculação. Para o tratamento 48 horas, apenas os produtos vinclozolin e propiconazole diferiram significativamente da testemunha. Portanto, tais produtos foram aqueles que mostraram melhor efeito curativo sobre as hastes das plantas

de melão. Entretanto, é importante salientar que o produto propiconazole, mesmo mostrando-se como o melhor tratamento curativo, tanto para haste como para as folhas, manifestou sintomas de fitotoxidez com forte efeito hormonal sobre as plantas, como já citado no item 4.2.2.1, sendo assim a sua aplicação na dosagem utilizada no presente trabalho não se faz recomendável. Quanto ao produto vinclozolin, este demonstrou ter um bom efeito curativo, tanto para folhas como em hastes analisadas independente do intervalo de inoculação e aplicação do fungicida.

O fungicida benomyl no presente ensaio não apresentou um bom efeito curativo, tanto nas folhas quanto na haste. Na literatura existem diversos trabalhos que comprovam tal efeito para outras relações patógeno-hospedeiro. Para relação *D. bryoniae* - cucurbitáceas, VAN STEEKELENBURG (1978) comparou o efeito protetor e curativo de diversos produtos químicos no controle da doença em plantas de pepino, entre eles benomyl foi o produto que mostrou melhor eficiência, tanto como protetor como curativo. Os ensaios daquele autor envolveram aplicações do produto nas concentrações de 250 e 500 µg/ml do ingrediente ativo e em ambas obtiveram os melhores resultados. Além disso, houve uma superioridade significativa do efeito curativo sobre o protetor. Comparando-se as condições do experimento realizado pelo referido autor, percebe-se que estas foram muito similares às do presente trabalho; todavia, a permanência das plantas inoculadas em câmara úmida ($UR\% \pm 100$) foi de 7 dias, enquanto que neste estudo foi de apenas 48 horas. KIMATI (1978) ao descrever as características dos fungicidas curativos sistêmicos, ressalta que a absorção pelas folhas é influenciada pela

duração de tempo que o fungicida permanece úmido, a alta umidade favorece, portanto, a penetração porque atrasa o secamento. FLETCHER & SHARPE (1978) ao trabalhar com plantas de tomate inoculadas com *Didymella lycopersici* obtiveram excelente nível de controle curativo quando aplicaram a mistura benomyl/Actipron (óleo mineral adjuvante) nas lesões nas hastes das plantas, enquanto que a aplicação de benomyl/água não mostrou tal resultado. Segundo aqueles autores a mistura produziu uma pasta que permaneceu na lesão sem haver secamento desta, mantendo sua consistência por toda a duração do experimento, o que deve ter permitido uma maior translocação do princípio fungitóxico. VAN STEEKELENBURG (1988) trabalhando com o mesmo patógeno-hospedeiro que os autores anteriores, também chegou à mesma conclusão, ou seja, conseguiu o melhor controle curativo com as misturas benomyl + óleo mineral ou iprodione + óleo mineral. Sendo assim, tais características essenciais à translocação do fungicida sistêmico podem estar associadas ao resultado do efeito curativo encontrado neste trabalho.

4.2.2.4 Efeito " imunizante " de iprodione e benomyl sobre *D. bryoniae*, inoculado em plantas de melão

A avaliação do efeito imunizante de iprodione e benomyl sobre as plantas de melão, inoculadas com *D. bryoniae* foi realizada segundo a escala de notas descrita no item 3.5.2 e ilustrada no item 4.2.2. A média das notas atribuídas às folhas e hastes quinze dias após a inoculação pode ser visualizada na tabela 14.

Tabela 14. Efeito imunizante de iprodione e benomyl sobre *D. bryoniae* inoculado em folhas e hastes de plantas de melão e avaliado 15 dias após a inoculação⁽¹⁾.

Ingrediente Ativo	Concentração i.a. (µg/ml)	Média das notas ⁽²⁾	
		folhas	haste
Testemunha	0	3,00 a ⁽³⁾	1,11 a
Iprodione	750	2,32 ab	0,20 b
Benomyl	350	1,92 b	0,44 b

(1) plantas inoculadas 16 dias após a rega das suspensões de fungicidas ao solo.

(2) médias originais das notas atribuídas às 1ª e 2ª folhas e às hastes, obtidas de 3 repetições.

(3) médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade (C.V.% dos dados transformados = 7,595, para avaliação nas folhas e C.V.% dos dados transformados = 9,138, para avaliação nas hastes).

Analisando-se a Tabela 14, percebe-se que benomyl mostrou-se eficiente na imunização das plantas tanto nas folhas, como nas hastes, diferindo estatisticamente da testemunha. O iprodione mostrou uma tendência de controle do patógeno nas folhas, mas não diferiu estatisticamente da testemunha. Em relação à haste ambos os fungicidas foram eficientes, diferindo estatisticamente da testemunha, e resultou em uma menor severidade da doença.

O ensaio conseguiu provar que ocorreu a translocação dos ingredientes ativos utilizados no interior da planta, já que houve uma diminuição na quantidade de doença, quando comparada à testemunha, ou então, havendo a absorção do produto pelas raízes, estes podem ter sofrido alguma hidrólise, como é o caso do benomyl, que se transforma em MBC (metil 2-benzimidazol carbamato), e seu princípio fungitóxico ter

se translocado e agido em sítios diferentes daqueles onde foram aplicados. Há a possibilidade ainda de compostos fungitóxicos terem induzido a produção de substâncias do tipo fitoalexinas, conferindo imunização das plantas graças a uma indução de resistência (MCINTYRE, 1982; OUCHI, 1983; SEQUEIRA, 1983; AGRIOS, 1988a; DIANESE, 1991).

No caso do fungicida iprodione, cujo modo de ação tem sido menos estudado do que para benomyl, CAYLEY & HIDE (1980) mostraram sua translocação sistêmica trabalhando com o controle de doenças em batata. Entretanto, aqueles autores ressaltaram que iprodione é fortemente adsorvido na grande maioria dos solos, especialmente aqueles com alto teor de matéria orgânica, o que dificultaria sua aplicação via solo como uma medida prática de controle. Por outro lado, Briggs *et al.* (1976)¹, citados por CAYLEY & HIDE (1980), observaram que para iprodione o valor do log P é de 2,89 (coeficiente de adsorção) e que se situa entre as classes de fungicidas nas quais haveria concentração do produto tanto nas folhas, como nas raízes e hastes, após sua absorção. EDGINGTON (1981) analisando os requisitos químicos necessários para o movimento sistêmico de fungicidas, ressalta que uma vez penetrado pelas raízes, sua translocação no interior da planta irá ocorrer dentro de uma faixa de log P entre -0.5 e 3.5. Sendo assim, iprodione parece ter capacidade suficiente de imunizar algumas

¹ BRIGGS, G.G.; BROMILOW, R.H.; EDMONSON, R.; JOHNSON, M. Herbicides and fungicides - factors affecting their activity (McFarlane, N. R., Ed.) Chemical Society Special Publication No. 29, London, 1976, p. 129-34.

plantas, mesmo que parte do seu composto fungitóxico mantenha-se adsorvida à matéria orgânica, contanto que a fração remanescente que tenha se translocado seja eficiente no controle do patógeno.

Portanto, pelos dados obtidos no presente ensaio verifica-se que a aplicação de alguns fungicidas sistêmicos via solo para o controle de *D. bryoniae* em plantas de melão é perfeitamente viável, já que ofereceu, para as condições do experimento, proteção até pelo menos o 16º dia após sua aplicação, tempo este suficiente para que os produtos se translocassem no interior das plantas e se acumulassem nos tecidos. Certamente, antes que se faça alguma recomendação à nível de campo, ensaios devem ser realizados variando-se as concentrações dos fungicidas e, sua persistência e eficiência dentro dos tecidos sejam avaliadas.

4.2.3 Sensibilidade de *D. bryoniae* inoculado em folhas destacadas, tratadas com diferentes fungicidas

A avaliação do efeito dos diferentes produtos químicos sobre as folhas destacadas, inoculadas com *D. bryoniae* foi realizada segundo a escala de notas citada no item 3.5.2. A média das notas atribuídas às folhas destacadas cinco dias após a inoculação pode ser visualizada na Tabela 15.

Tabela 15. Efeito de diferentes produtos químicos sobre *D. bryoniae*, inoculado em folhas destacadas de melão, avaliado 5 dias após a inoculação.

Ingrediente Ativo	Concentração i. a. (µg/ml)	Média das notas ⁽¹⁾
Testemunha	0	2,74 a ⁽²⁾
Iprodione	750	0,72 b
Chlorothalonil + tiofanato metílico	1.000 400	0,46 bc
Benomyl	350	0,22 bc

(1) médias originais das notas atribuídas às folhas destacadas, obtidas de 4 repetições.

(2) médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade (C.V.% dos dados transformados = 13,686).

Analizando-se a Tabela 15 percebe-se que todos os fungicidas utilizados mostraram-se como eficientes no controle do patógeno, diferindo estatisticamente da testemunha. Os fungicidas chlorothalonil + tiofanato metílico e benomyl mostraram uma leve superioridade em relação ao iprodione, não diferindo, entretanto, estatisticamente deste.

Segundo a metodologia utilizada neste ensaio, a avaliação efetuada mediu o efeito erradicante de cada produto. Efetuando-se uma comparação entre os resultados obtidos em folhas destacadas (Tabela 15) e em plantas inteiras (Tabela 10) nota-se que houve boa correlação destes, ou seja, benomyl e iprodione mostraram-se como bons produtos erradicantes nas folhas de plantas inteiras, assim como, em folhas destacadas. Para a mistura chlorothalonil + tiofanato metílico essa correlação não

aconteceu, já que em plantas inteiras tal efeito não diferiu da testemunha, enquanto que em folhas destacadas houve diferença significativa. A razão desse comportamento pode ser atribuída às condições do ensaio de folhas destacadas, que podem ter interferido no próprio modo de ação do produto.

O número de trabalhos presente na literatura que utiliza material vegetal destacado para se comprovar a patogenicidade em diferentes relações patógeno-hospedeiro é realmente extenso. Entretanto, o uso de folhas destacadas para se efetuar uma triagem de fungicidas, não é técnica usualmente empregada. CHEE *et al.* (1986) trabalhando com discos de folha de seringueira inoculados com *Microcylus ulei* conseguiram boas estimativas da efetividade e propriedades curativas de diversos fungicidas e da sua aplicabilidade em campo.

No presente trabalho, os resultados deste ensaio de folhas destacadas mostram indícios de que a seleção de um grande número de produtos a serem testados em campo, podem ser previamente escolhidos em laboratório, sob condições controladas, através do uso de folhas destacadas.

4.3 Controle Biológico

4.3.1 Isolamento de bactérias antagônicas a *D. bryoniae*

Foram isoladas bactérias antagônicas de todas as amostras de solo coletadas (Tabela 4). Devido ao tipo de crescimento (aspecto e velocidade) e odor característico dos isolados em placas com meio BDA, além da temperatura sob as quais

sofreram o isolamento (80 ± 3 °C), considerou-se que se tratavam de bactérias do gênero *Bacillus*. O número total de isolados obtidos foi de 50.

4.3.2 Seleção das bactérias mais antagônicas

A porcentagem de inibição de crescimento de *D. bryoniae* induzida pelos 11 isolados de bactérias, selecionados dentre os 50 iniciais, pode ser visualizada na tabela 16.

Analisando-se a tabela 16 percebe-se que os isolados B2.3Di, B10.4Di, B2.2Di, B10.2Di, B10.3Di e B8Di mostraram porcentagem de inibição relativamente próximas, não diferindo significativamente entre si; entretanto, os isolados B2.3Di e B10.4Di apresentaram uma leve superioridade frente aos demais, sendo assim eleitos para os trabalhos visando estudos de antagonismo em relação a *D. bryoniae*.

Tabela 16. Porcentagem média de inibição "in vitro" do crescimento micelial de *D. bryoniae* por 11 isolados de bactérias.

Código dos isolados	% de inibição ⁽¹⁾
B2.3Di	82,7 a ⁽²⁾
B10.4Di	82,1 a
B2.2Di	79,8 ab
B10.2Di	75,3 abc
B10.3Di	72,3 abcd
B8Di	71,8 abcd
B10.5Di	68,4 bcd
B5.2Di	62,5 cde
B2.1Di	62,5 de
B2.4Di	52,5 ef
B6Di	43,75 f

(1) médias originais das porcentagens de inibição, obtidas de 3 repetições.

(2) médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (C.V.% dos dados transformados = 4,094).

4.4 Controle Químico x Controle Biológico

4.4.1 Tratamento de sementes

4.4.1.1 Inoculação das sementes de melão e transmissibilidade

A incidência do patógeno em sementes artificialmente inoculadas foi avaliada segundo a presença de picnídios pretos nas suas superfícies, sendo observado também em grande parte dos seedlings a podridão da radícula com numerosos picnídios (LEE *et al.*, 1984). Quando deparou-se frente a estruturas de identificação duvidosa sob o microscópio estereoscópio, lâminas foram feitas e examinadas sob microscópio comum verificando a existência de conídios típicos do patógeno no interior dos corpos de frutificação.

A porcentagem média da incidência do patógeno nas sementes segundo as diferentes concentrações de inóculo e diferentes tempos de embebição pode ser visualizada na Tabela 17.

Tabela 17. Porcentagem média da incidência de *D. bryoniae* em sementes de melão, inoculadas artificialmente sob diferentes concentrações de inóculo e tempos de embebição.

Concentração de Inóculo (esporos/ml)	Tempo de embebição (minutos)	
	30	120
10^3	15,9 a A ^(1,2)	58,0 a B
10^5	71,3 b A	75,5 b A

(1) médias originais da porcentagem da incidência, obtidas de 4 repetições.

(2) médias seguidas pela mesma letra (minúscula na coluna e maiúscula na linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (C.V.% dos dados transformados = 9, 815).

Analisando-se a Tabela 17, verifica-se que a incidência do patógeno nas sementes foi sempre maior para a concentração de 10^5 esporos/ml, diferindo estatisticamente do tratamento de menor concentração de inóculo, para os dois tempos de embebição testados. Pode-se verificar também que para a concentração de 10^3 esporos/ml houve diferença estatística quanto ao tempo de embebição, obtendo-se a maior porcentagem de incidência para o maior tempo, ou seja, 120 minutos; para a concentração de 10^5 esporos/ml as incidências apresentadas não diferiram estatisticamente entre si independente dos dois tempos de embebição testados.

A porcentagem média da transmissibilidade do patógeno em seedlings de melão, obtidas de sementes previamente inoculadas segundo diferentes concentrações de inóculo e tempos de embebição, pode ser visualizada na Tabela 18.

Tabela 18. Porcentagem média de transmissibilidade de *D. bryoniae* em plântulas de melão obtidos de sementes infestadas com diferentes concentrações de inóculo e tempos de embebição.

Concentração de Inóculo (esporos/ml)	Tempo de embebição (minutos)	
	30	120
10^3	10,0 a A ^(1,2)	38,0 a B
10^5	54,0 b A	62,0 b A

(1) médias originais da porcentagem da incidência, obtidas de 5 repetições.

(2) médias seguidas pela mesma letra (minúscula na coluna e maiúscula na linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (C.V.% dos dados transformados = 23,388).

Analisando-se a Tabela 18 verifica-se que a transmissibilidade do patógeno foi proporcional ao índice de infecção do mesmo nas sementes artificialmente inoculadas, ou seja, a porcentagem de transmissão foi sempre maior para as sementes inoculadas com maior concentração de inóculo, para os dois tempos de embebição testados; para a concentração de 10^3 esporos/ml o tempo de embebição de 120 minutos foi suficiente para mostrar maior transmissibilidade do patógeno do que no tempo de 30 minutos, diferindo estatisticamente deste, enquanto que, para a concentração de 10^5 esporos/ml a transmissibilidade do patógeno não diferiu estatisticamente entre os dois tempos de embebição testados.

LEE *et al.* (1984), procurando localizar *D. bryoniae* em sementes de pepino e abóbora, naturalmente infectadas, encontraram o patógeno nos tegumentos, perisperma e cotilédones; entretanto, a maior porcentagem de ocorrência se deu nos tegumentos, enquanto que a incidência nos cotilédones foi muito baixa, ou até mesmo

inexistente.

No presente trabalho, devido à forma artificial de inoculação realizada, a grande incidência do patógeno nas sementes deve ter ocorrido nos tegumentos destas, permitindo, assim, sua transmissão às plantas de melão e não diferindo muito da localização do mesmo em sementes naturalmente infectadas, conforme trabalho dos autores anteriormente citados.

Sendo assim, para se efetuar as inoculações das sementes de melão em ensaios subsequentes, utilizou-se do binômio 10^5 esporos/ml por um tempo de embebição de 30 minutos.

Ressalta-se que este tipo de inoculação por um curto período de tempo (30 minutos) é inédito para o patógeno em estudo, já que a maioria dos autores têm preferido imergí-las em suspensões de esporos por 48 horas (RANKIN, 1954; LEE *et al.*, 1984) ou por até 56 horas (BROWN & PREECE, 1968).

4.4.1.2 Controle químico x controle biológico

Os resultados obtidos pela microbiolização das sementes de melão objetivando-se o controle de *D. bryoniae*, comparado com o tratamento químico das mesmas, pode ser visualizado na Tabela 19.

Tabela 19. Avaliação da incidência de *D. bryoniae* em sementes de melão artificialmente inoculadas, tratadas com fungicidas e com agentes de controle biológico.

Tratamentos	Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Incidência ⁽¹⁾ (%)
Testemunha 1 ⁽²⁾	0	62,5 a ⁽⁴⁾
Testemunha 2 ⁽³⁾	0	61,0 a
B10.4Di	-	60,0 a
B2.3Di	-	21,0 b
iprodione	750	5,5 c
tiofanato metílico + Chlorothalonil	1.000 400	0,5 c
benomyl	350	0,5 c

(1) médias originais da incidência do patógeno na semente, obtidas de 4 repetições.

(2) sementes embebidas por 30 minutos em suspensão de 10^5 esporos/ml.

(3) sementes embebidas por 30 minutos em suspensão de 10^5 esporos/ml, tratadas com caldo de batata-dextrose estéril.

(4) médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (C.V.% dos dados transformados = 21,415).

Analisando-se a Tabela 19 verifica-se que o agente de controle biológico B10.4Di não se mostrou eficiente no controle do patógeno nas sementes, não diferindo estatisticamente da testemunha. Já o agente B2.3Di conseguiu reduzir significativamente a incidência do mesmo quando comparado à testemunha. Entretanto, comparando-se a eficácia dos tratamentos constituídos por produtos químicos com aqueles de atividade biológica, verifica-se que houve diferença significativa entre ambos, mostrando-se, os primeiros, muito superiores e quase alcançando a erradicação total do patógeno como os

produtos tiofanato metílico + chlorothalonil e benomyl. É importante ressaltar que o nível de controle obtido pelo agente B2.3Di foi devido exclusivamente aos metabólitos produzidos no meio em que foi cultivado, já que o caldo de batata-dextrose esterilizado não mostrou qualquer eficiência de controle.

LUZ (1993) realizou extensa revisão sobre a microbiolização de sementes para o controle de doenças de plantas, apontando uma série de vantagens dos bioprotetores sobre os produtos químicos, lembrando porém, dos obstáculos potenciais do uso dos agentes biológicos, os quais não agem no mesmo espectro de condições de ambiente favoráveis à doença como operam os fungicidas sintéticos. Dentro desse quadro, uma série de trabalhos que comparam o controle químico e biológico podem ser analisados. UTKHEDE & RAHE (1980) ao trabalhar com a podridão branca da cebola (*Sclerotium cepivorum*), em experimento de campo, conseguiram isolados de *Bacillus subtilis* os quais conferiram proteção às sementes, através da sua microbiolização, e emergência destas, comparáveis aos tratamentos com vinclozolin e iprodione. PARKE (1990) não encontrou diferença significativa na eficiência de controle do tombamento de pré-emergência de ervilha, causado por *Pythium ultimum* e *P. sylvaticum*, ao microbiolizar as sementes com um isolado de *Pseudomonas cepacia* e ao tratá-las com metalaxyl, sob diferentes temperaturas em câmara de crescimento. CASAS *et al.* (1990), mediante tratamento de sementes de grão-de-bico com 6 fungicidas e 5 agentes de controle biológico visando o controle de diferentes espécies de *Pythium*, observaram que as melhores emergências (89 a 97% em relação à testemunha) foram obtidas com o

tratamento químico, e para o controle biológico obtiveram 42 a 52% em relação à testemunha. Em trabalho recente, LAZZARETTI (1993) ao microbiolizar sementes de trigo com isolados de *Bacillus subtilis*, observou que nem sempre conseguia baixar a incidência de diversos patógenos transportados por estas a níveis similares àqueles obtidos pelo tratamento químico. Segundo aquele autor resultados estatisticamente semelhantes ao controle químico somente foram obtidos mediante a imersão das sementes em culturas da bactéria por longos períodos (5 horas).

Em vista dos resultados apresentados e dos dados apontados pela literatura, não se considerando os possíveis efeitos benéficos que agentes antagônicos vinculados à semente trariam à rizosfera (LUZ, 1993), verifica-se que a microbiolização de sementes não conseguiu ainda se constituir em uma alternativa comparável à eficiência dos fungicidas para o tratamento de sementes. Sendo assim, maiores estudos são necessários para que se utilize a microbiolização das sementes para o binômio *D. bryoniae* x melão como prática agrícola de uso comum.

Finalmente, deve-se considerar que a decisão de se tratar as sementes é tomada, logicamente, antes da semeadura e, algumas vezes, imediatamente após o beneficiamento. Assim, caso exista probabilidade da doença causar danos à cultura, recomenda-se o tratamento de sementes, que devido ao baixo custo de operação, constitui-se de um seguro extremamente barato. Além disso, o tratamento, mesmo com produtos químicos, apresenta uma grande vantagem: são aplicados de maneira localizada na semente e em baixas quantidades (15-200g i.a./100kg de semente), causando menor

impacto sobre o ambiente quando comparado ao emprego de fungicidas em pulverização na parte aérea das plantas (MENTEN, 1991).

4.4.2 Efeito do fungicida iprodione e agentes de controle biológico sobre *D. bryoniae*, inoculado em plantas de melão

A avaliação do efeito de iprodione e agentes de controle biológico sobre *D. bryoniae*, inoculado em plantas de melão foi realizada segundo a escala de notas descrita no item 3.5.2 e ilustrada, para a avaliação na haste, na Figura 1 no item 4.2.2. A média das notas atribuídas às folhas e hastes é apresentada na tabela 20.

Tabela 20. Efeito de iprodione e agentes de controle biológico sobre as folhas e hastes das plantas de melão, inoculadas com *D. bryoniae*, avaliadas 15 dias após a inoculação.

Tratamentos	Concentração i.a. (µg/ml)	Média das notas ⁽¹⁾	
		folha	haste
Testemunha	0	2,15 a ⁽²⁾	2,32 a
B10.4Di	-	1,77 a	2,32 a
B2.3Di	-	1,41 ab	1,12 ab
Iprodione	750	0,60 b	0.00 b

(1) médias originais das notas atribuídas às 1ª e 2ª folhas e hastes, obtidas de 3 repetições.

(2) médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (C.V.% dos dados transformados = 9,470).

Analisando-se a Tabela 20 verifica-se que o isolado B10.4Di não mostrou efeito significativo no controle da doença, tanto para as folhas como para as hastes, não diferindo estatisticamente da testemunha. O isolado B2.3Di mostrou um nível de controle intermediário, não diferindo estatisticamente da testemunha assim como do controle químico, conseguindo reduzir o índice da doença, tanto para as folhas como para a haste. O controle químico mostrou-se eficiente para as folhas e haste, diferindo estatisticamente da testemunha e do isolado B10.4Di.

A utilização de antagonistas isolados do solo e introduzidos para o controle de doenças da parte aérea, parece não ser técnica adequada, como alerta Alexander (1971)¹, citado por HENIS & CHET (1975), uma vez que a microflora existente no ambiente resiste aos recém-chegados, prevenindo seu estabelecimento no ecossistema. Este fato, além da capacidade adaptativa, interfere na sobrevivência destes antagonistas no filoplano e conseqüentemente sobre sua atividade de controle.

BAKER *et al.* (1983) verificaram que um isolado de *B. subtilis*, originário do solo, reduziu em 95% o número de pústulas de ferrugem do feijoeiro, quando aplicado em cultura líquida nas plantas em casa-de-vegetação, 2 a 120 horas antes da inoculação de uredíniosporos de *U. phaseoli*. Sob condições de campo, BAKER *et al.* (1985) observaram redução de no mínimo 75% na ocorrência de ferrugem com três aplicações semanais do antagonista. PUSEY (1989), estudando o uso de *B. subtilis* como biofungicida no controle de doenças de pós-colheita, obteve atividades contra fungos

¹ ALEXANDER, M. Microbiological Ecology. Wiley, New York, 1971.

causadores de podridão de maçã, causados por *Monilinia fruticola*, *Botrytis cinerea* e *Glomerella cingulata* e, para o mofo cinzento da uva, causado por *B. cinerea*, o que mostra a falta de especificidade do microorganismo.

KATZ & DEMAINE (1977) mostraram que dos 167 antibióticos produzidos pelo gênero *Bacillus*, 66 são elaborados por *B. subtilis* e que estes antibióticos, principalmente polipeptídeos, podem apresentar ação contra bactérias Gram positivas e negativas e fungos. Com essa gama de antibióticos produzidos por bactérias do gênero *Bacillus*, acredita-se que seu principal mecanismo de ação em interações antagonísticas seja a antibiose (LUZ, 1993).

No presente trabalho, a diminuição do índice de doença tanto na parte aérea, como nas sementes, apresentada pelo isolado B2.3Di, poderá ser atribuída à produção de antibióticos, devendo este ser seu principal mecanismo de ação. Vale ressaltar entretanto, que o uso deste agente de controle biológico selecionado possivelmente se tornará tecnicamente viável após estudos mais detalhados do mesmo, como identificação dos antibióticos produzidos, pico de produção, temperatura ótima de desenvolvimento, meio mais adequado para o seu cultivo e estudos de formulação, entre outros fatores.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados encontrados no presente trabalho, pode-se concluir que houve uma boa correlação da seleção "in vitro" com a seleção em casa-de-vegetação, tanto dos agentes antagônicos, como dos fungicidas. Além disso, o controle biológico, representado pelas bactérias antagônicas ao patógeno, mesmo apresentando certo nível de controle, tanto nas sementes como nas plantas em casa-de-vegetação, ainda se mostrou inferior ao controle químico, representado pelos fungicidas iprodione e benomyl, que revelaram-se como bons produtos protetores, além de vinclozolin e iprodione, que mostraram-se como bons produtos curativos. Além da pulverização foliar dos produtos, a rega do solo com iprodione ou benomyl, se mostrou viável como nova forma de aplicação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. How plants defend themselves against pathogens. In: AGRIOS, G.N. Plant Pathology. 3 edition, San Diego, Academic Press, 1988a, cap.5, p. 97-115.
- AGRIOS, G.N. Control of plant diseases. In: AGRIOS, G.N. Plant Pathology. 3. edition, San Diego, Academic Press, 1988b, cap. 9, p. 180-233.
- ANAGNOSTAKIS, S.L. Biological control of chestnut blight. Science, Alexandria, **215**: 466-71, 1982.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL - 1993, Rio de Janeiro, **53**: 3-1 - 3-66, 1993.
- ARNY, C.J. & ROWE, R.C. Effects of temperature and duration of surface wetness on spore production and infection of cucumbers by *Didymella bryoniae*. Phytopathology. St. Paul, **81**(2): 206-9, 1991.
- BAKER, K.F. & COOK, R.J. Biological control of plant pathogens. San Francisco, W.H. Freeman, 1974. 433p.

- BAKER, C.J.; STAVELY, J.R.; MOCK, N. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. Plant Disease, St. Paul, **69**(9): 770-2, 1985.
- BAKER, C.J. ; STAVELY, J.R.; THOMAS, C.A.; SASER, M.; MAC FALL, J.S. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and development of rust pustules on bean leaves. Phytopathology, St. Paul, **73**(8): 1148-52, 1983.
- BALA, G. & FARZAN, H. Gummy stem blight of watermelon and its control. Journal of the Agricultural Society of Trinidad & Tobago, Port-of-Spain, **85**(2): 17-23, 1985.
- BALA, G. & FARZAN, H. Studies on gummy stem blight disease of cucurbits in Trinidad. Tropical Agriculture, Trinidad, **63**(2): 195-7, 1986.
- BECKER, J.O. & SCHWINN, F.J. Control of soil-borne pathogens with living bacteria and fungi: status and outlook. Pesticide Science, Essex, **37**: 355-63, 1993.
- BERGSTRON, G.C.; KNAVEL, D.E.; KUC, J. Role of insect injury and powdery mildew in the epidemiology of gummy stem blight disease of cucurbits. Plant Disease, St. Paul, **66**(8): 683-6, 1982.

- BLAKEMAN, J.P. & FOKKEMA, N.J. Potential for biological control of plant diseases on the phyloplan. Annual Review of Phytopathology, St.Paul, **20**: 167-92, 1982.
- BOOLSALIS, M.G. Hyperparasitism. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, **2**: 363-76, 1964.
- BROADBENT, P.; BAKER, K.F.; WATERWORTH, Y. Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. Australian Journal of Biological Sciences, Victoria, **24**: 925-44, 1971.
- BROWN, M.E. & PREECE, T.F. Examination of cucumber seed for *Mycosphaerella melonis*. Plant Pathology, Oxford, **17**: 116-8, 1968.
- BROWN, M.E.; HOWARD, E.M.; KNIGHT, B.C. Seed-borne *Mycosphaerella melonis* on cucumber. Plant Pathology, Oxford, **19**: 198, 1970.
- CARDOSO, C.O.N.; FIGUEIREDO, M.B.; PALAZZO, D.; MARTINEZ, J.A. Epidemiology of fruit rot (*Mycosphaerella melonis* (Pass.) Chiu & Walker) on italian squash (*Cucurbita pepo*. L.). Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, **41**(1): 35-7, 1974.

- CASAS, A.T.; KAISER, W.J.; INGRAM, D.M. Control of *Pythium* seed rot and preemergence damping-off chickpea in the U.S. Pacific Northwest and Spain. Plant Disease, St. Paul, **74**(8): 563-9, 1980.
- CAYLEY, G.R. & HIDE, G.A. Uptake of iprodione and control of diseases on potato stems. Pesticide Science, Essex, **11**: 15-9, 1980.
- CHEE, K.H.; DARMONO, T.W.; SANTOS, A.F. dos. Laboratory screening of fungicides using cellulose film and discs against South American leaf blight pathogen, *Microcyclus ulei*. Journal of Natural Rubber Research, Kuala Lumpur, **1**(2): 98-103, 1986.
- CHIU, W.F. & WALKER, J.C. Physiology and pathogenicity of the cucurbit black-rot fungus. Journal of Agricultural Research, Washington, **78**(12): 589- 615, 1949.
- COOK, R.J. Biological control of the pathogens: theory to application. Phytopathology, St. Paul, **75** (1): 25-9, 1985.
- COOK, R.J.; BAKER, K.F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1983. 539p.

- CORBAZ, R. Recherches sur le genre *Didymella* Sacc. Phytopathologische Zeitschrift, Berlin, **28**: 375-414, 1957.
- CORLETT, M. A taxonomic survey of some species of *Didymella* and *Didymella*-like species. Canadian Journal of Botany, Ottawa, **59**(11): 2016-42, 1981.
- DA MATTA, E.A.F.; LUNA, A.M.F.; BENEVIDES, L.E. Ocorrência de *Mycosphaerella melonis* (Pass.) Chiu & Walker no Nordeste, na região do médio São Francisco, em cultivos de melão (*Cucumis melo* L.). Boletim do Instituto Biológico da Bahia, Salvador, **13**(1): 71-5, 1974.
- DAVIDSE, L.C. & WAARD, M.A. Systemic fungicides. Advances in Plant Pathology, London, **2**: 191-257, 1984.
- DELP, C.J. & KLÖPPING, H.L. Performance attributes of a new fungicide and mite ovicide candidate. Plant Disease Reporter, St. Paul, **52**: 95-9, 1968.
- DIANESE, J.C. Mecanismos de defesa da planta. In: DIANESE, J.C. Patologia vegetal: agressão e defesa em sistemas planta/patógeno, 2ª edição, Brasília, Editora Universidade de Brasília, 1991, p. 56-65.

DOW, A.T.; SEGALL, R.H.; HOPKINS, D.L.; ELMSTROM, G.W. Effects of storage temperature and field fungicide treatments on decay of Florida watermelons. Proceedings of the Florida State Horticultural Society, Lake Alfred, **91**: 149-50, 1978.

DUSI, A.N.; TASAKI, S.; VIEIRA, J.V. Metodologia para avaliação da resistência ao cancro da haste (*Didymella bryoniae*) em melão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 26., Aracajú, 1993. Fitopatologia Brasileira, Brasília, **18**: 324, ago. 1993. Suplemento.

EDGINGTON, L.V. Structural requirements of systemic fungicides. Annual Review of Phytopathology, St. Paul, **19**: 107-24, 1981.

FIGUEIREDO, M.B. Aboboreira com "queima" nas hastes. O Biológico, São Paulo, **83**: 83, 1965.

FIGUEIREDO, M.B. Estudos fisiológicos e sorológicos sobre o fungo *Ascochyta phaseolorum* Sacc. e sobre a doença por ele causada em beringela (*Solanum melongena* L.) e em outras plantas cultivadas. Piracicaba, 1972. 130p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

FIGUEIREDO, M.B.; CARDOSO, R.M.G. Ocorrência de *Mycosphaerella melonis* (Pass) Chiu & Walker em cultura de melancia no estado de São Paulo. O biológico, São Paulo, 30: 324-5, 1964.

FIGUEIREDO, M.B.; CARDOSO, R.M.G.; ABRAHÃO, J. Perdas causadas pelo fungo *Mycosphaerella melonis* (Pass.) Chiu & J. C. Walker em aboboreira de moita. O Biológico, São Paulo, 32: 203-5, 1966.

FIGUEIREDO, M.B.; CARDOSO, R.M.G.; HARRUDA, H.V. Blosson excision as a method of controlling frit infection caused by *Mycosphaerella melonis* (Pass.) Chiu & Walker in italian squash (*Cucurbita pepo* L.). Anais do Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, 37(4): 285-92, 1970

FLETCHER, J.T. & PREECE, T.F. *Mycosphaerella* stem rot of cucumbers in Lea Valley. Annals of Applied Biology, Wellesbourne, 58: 423-30, 1966.

FLETCHER, J.T & SHARPE, K. Control of *Didymella lycopersici* on tomato stems with fungicidal paints. Plant Pathology, Oxford, 27: 194-7, 1978.

- GHINI, R. Integração do controle biológico com outros métodos de controle de doenças de plantas. In: BETTIOL, W., org. Controle Biológico de Doenças de Plantas. Jaguariúna-SP, EMBRAPA/CNPDA, 1991, cap.13, p. 201-18.
- GHINI, R. & KIMATI, H. Método de iscas para obtenção de isolados de Trichoderma antagônicos a *Botrytis cinerea*. Jaguariúna, EMBRAPA/CNPDA, 1989. 13p. (EMBRAPA/CNPDA. Boletim de Pesquisa, 3).
- GOES, A. de Caracterização patogênica, controle químico e obtenção da fase sexuada de *Fusarium moniliforme* Sheld. var. *subglutinans* Wr. & Rg do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr.). Piracicaba, 1986, 121p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- GROSSENBACHER, J.G A *Mycosphaerella* wilt of melons. Geneva, New York Agricultural Experiment Station, 1909. 29p. (Technical Bulletin, 9).
- HANLIN, R. T. Illustrated Genera of Ascomycetes. St. Paul, APS Press, 1990. 263p.
- HENIS, Y. & CHET, I. Microbiological control of plant pathogens. Advances in Applied Microbiology, Madison, 19: 85-111, 1975.

JEYANANDARAJAH, P. Seed-borne fungi of some important crops grown in Sri Lanka. Seed Science and Technology, Zurich, **19**: 633-46, 1991.

KAGIWATA, T. Brown heart rot of the cucumber caused by *Mycosphaerella melonis* (Pass.) Chiu & Walker and its control. Review of Plant Protection Research, Tokyo, **3**: 94-7, 1970.

KATZ, E. & DEMAINE, A.L. The peptide antibiotics of *Bacillus* chemistry, biogenesis, and possible functions. Bacteriological Review, Washington, **41**(2): 449-74, 1977.

KERR, A. Biological control of crown gall through production of Agrocin 84. Plant Disease, St. Paul, **64**: 24-30, 1980.

KHARBANDA, P.D. Performance of fungicides to control blackleg of canola. Canadian Journal of Plant Pathology, **14** (2): 169-76, 1992.

KIMATI, H. Fungicidas. In: GALLI, F., coord. Manual de fitopatologia, 2. ed. São Paulo, Ceres, 1978. v.1, cap.18, p.325-73.

KIMATI, H.; CARDOSO, C.O.N.; BERGAMIN, F. Doenças das cucurbitáceas (abóbora, abobrinha, melancia, melão, moranga, pepino). In: GALLI, F., ed. Manual de fitopatologia, São Paulo, Ceres, 1980, v.2, cap. 16, p. 251-69.

KIMATI, H.; SOAVE, J.; ESKES, A.B.; KUROSAWA, C.; BRIGNANI NETO, F; FERNANDES, NG. Guia de fungicidas agrícolas. Piracicaba, Livroceres, 1986. 281p.

KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Development of a powder formulation of rhizobacteria for inoculation of potato seed pieces. Phytopathology, St. Paul, 71: 590-2, 1981.

LAZZARETTI, E. Controle de fungos transportados por sementes de trigo com *Bacillus subtilis*. Piracicaba, 1993. 102p. (Mestrado- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz/USP).

LEE, D.H. Effects of light and media on pycnidial formation of *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm. Korean Journal of Plant Pathology, Suwon, 16(4): 211-5, 1977.

LEE, D.H. Pathogenicity of *Didymella bryoniae* on the seedlings of cucurbits. Korean Journal of Plant Pathology, Suwon, 1(3): 173-7, 1985.

- LEE, D.H.; MATHUR, S.B.; NEERGAARD, P. Detection and location of seed-borne inoculum of *Didymella bryoniae* and its transmission in seedlings of cucumber and pumpkin. Journal of Phytopathology, Berlin, **109**(4): 301-8, 1984.
- LESKI, B. Black fruit - and stem rot caused by *Didymella bryoniae* an important disease of glasshouse cucumber - new to Poland. Acta Horticulturae, Wageningen, **156**: 245-248, 1984.
- LINDOW, S.E. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, **21**: 363-84, 1983.
- LUEPSCHEN, N.S. The development of *Mycosphaerella* black rot and *Pellicularia* rot of watermelons at various temperatures. Plant Disease Reporter, Washington, **45**(7): 557-559, 1961.
- LUZ, E.D.M.N. Patogenicidade e transmissão de *Mycosphaerella melonis* (Pass.) Chiu & Walker e tratamento de sementes de melão com fungicidas. Viçosa, 1977. 67p. (Mestrado-Universidade Federal de Viçosa).

LUZ, W.C. Microbiolização de sementes para o controle de doenças das plantas. In:

LUZ, W.C. ed. Revisão anual de patologia de plantas. Passo Fundo, RAPP, 1993, v.1, p.33-77.

MALATHRAKIS, N.E & VAKALOUNAKIS, D.J. Resistance to benzimidazole fungicides in the gummy stem blight pathogen *Didymella bryoniae* on cucurbits. Plant Pathology, Oxford, **32**: 395-9, 1983.

MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção "in vitro" para o controle microbiológico de patógenos de plantas. In: LUZ, W.C. ed. Revisão anual de patologia de plantas. Passo Fundo, RAPP, 1993, v. 1, p. 369-409.

MARTIN, H. & WORTHING, C.R., ed. Pesticide manual. 5. ed. Nottingham, British Crop Protection Council, 1977. 593p.

MARX, D.H. Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infections. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, **10**: 429-54, 1972.

MCINTYRE, J.L. Induced Resistance. In: MOUNT, M.S. & LACY, G.H. Phytopathogenic prokaryotes. New York, Academic Press, 1982, cap. 7, p. 137-47.

MEINHARDT, F. Biological control of plant pathogenic fungi. Progress in Botany, Berlin, 46: 241-7, 1984.

MENTEN, J.O.M. Importância do tratamento de sementes. In: MENTEN, J.O.M., ed., Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico. Piracicaba, ESALQ/FEALQ, 1991. p. 203-24.

MORALES-BANCE, F. *Didymella bryoniae* em siembras de melon del occidente de Venezuela. Fitopatologia Venezolana, Maracay, 14(7): 41-5, 1979.

MUCHARROMAH, E. & KUC, J. Oxalate and phosphates induce systemic resistance against diseases caused by fungi, bacteria and virus in cucumber. Crop Protection, Guildford, 10: 265-70, 1991.

NEERGAARD, E. Studies of *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm: development in the host. Journal of Phytopathology, Berlin, 127: 107-15, 1989.

NORTON, J.D. Gulfcoast - a sweet cantaloupe for the produce chain store market. Auburn, Alabama Agricultural Experimental Station, 1971, 82p.

NORTON, J.D. Chilton - a high quality fruit for the commercial market. Auburn, Alabama Agricultural Experimental Station, 1972, 84p.

NORTON, J.D.; COSPER, R.D.; SMITH, D.A.; RYMAL, K.S. Aurora - a high quality disease resistant cantaloupe. Auburn, Alabama Agricultural Experimental Station, 1985, 278p.

NORTON, J.D.; COSPER, R.D. AC-70-154, a gummy stem blight-resistant muskmelon breeding line. HortScience, Alexandria, **24**(4): 709-11, 1989.

OUCHI, S. Induction of resistance or susceptibility. Annual Review of Phytopathology, St. Paul, **21**: 289-315, 1983.

PARKE, J.L. Populations dynamics of *Pseudomonas cepacia* in the pea spermosphere in relation to biocontrol of *Pythium*. Phytopathology, St. Paul, **80**(12): 1307-11, 1990.

PASCHOLATI, S.F. Aspectos fisiológicos do fungo *Mycosphaerella melonis* (Pass.) Chiu & Walker e estudos sobre a indução de resistência em plantas de melão (*Cucumis melo* L.). Campinas, 1980. 73p. (Mestrado - UNICAMP).

PASCHOLATI, S.F.; MORAES, W.B.C.; FIGUEIREDO, M.B.; OLIVEIRA, A.R.

Induced protection in melon plants against *Mycosphaerella melonis* by prior inoculation with *Helminthosporium carbonum* or heat-inactivated *M. melonis*.

Fitopatologia Brasileira, Brasília, 11(3): 507-14, 1986.

PEREGRINE, W.T.H.; AHMAD, K.; MOMIN, M. Controlling anthracnose in water melon. World Crops, Surrey, :184-5, Sept./Oct., 1984.

PUNITHALINGAM, E. & HOLLIDAY, P. *Didymella bryoniae*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria, No. 332. In: Commonwealth Mycological Institute, Commonwealth Mycological Bureaux, 1972.

PUSEY, P.L. Use of *Bacillus subtilis* and related organisms as biofungicides. Pesticide Science, Essex, 27: 133-40, 1989.

RANKIN, H.W. Effectiveness of seed treatment for controlling anthracnose and gummy stem blight of watermelon. Phytopathology, St. Paul, 44: 675-80, 1954.

RODRIGUES, C.H.; ZAMBOLIN, L.; MARTINS, M.C. Eficiência de fungicidas no controle da mancha angular (*Isariopsis griseola*) do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). Fitopatologia Brasileira, Brasília, 12 (1): 40-5, 1987.

SCHENCK, N.C. Epidemiology of gummy stem blight (*Mycosphaerella citrullina*) on watermelon: ascospore incidence and disease development. Phytopathology, St. Paul, **58**: 1420-22, 1968 a.

SCHENCK, N.C. Incidence of airborne fungus spores over watermelon fields in Florida. Phytopathology, St. Paul, **58**: 91-4, 1968 b.

SCHENCK, N.C. An epidemiological coparison of downy mildew and gummy stem blight diseases onwatermelon. Proceedings of Florida State Horticultural Society, Lake Alfred, **82**: 151-4, 1969.

SCHROTH, M.N.; HANCOCK, J.G. Selected topics in biological control. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, **35**: 453-76, 1981.

SEQUEIRA, L. Mechanisms of induced resistance in plants. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, **37**: 51-79, 1983.

SITTERLY, W.R. A new symptom of gummy stem blight (*Mycosphaerella melonis*) on cucumber fruit. Plant Disease Reporter, St. Paul, **52**(1):116-8, 1968.

SITTERLY, W.R. Effect of crop rotation on cucumber gummy stem blight. Plant Disease Reporter, St. Paul, **53**(6): 417-9, 1969.

SOWELL, G. & POINTER, G.R. Gummy stem blight resistance of introduced water melons Plant Disease Reporter, St. Paul, **46**: 883-5, 1962.

THINGGAARD, K. Attack of *Didymella bryoniae* on roots of cucumber. Journal of Phytopathology, Berlin, **120**: 372-5, 1987.

TSAY, J.; TZEN, S.; TUNG, B. Variety susceptibility, and screening of fungicides for the control of gummy stem blight of cucurbits. Separata de Journal of National Chia-Yi, Institute of Agriculture, Taiwan, **30**: 81-90, Sept. 1992.

UTKHEDE, R.S. & RAHE, J.E. Biological control of onion white rot. Soil Biology Biochemistry, Taiwan, **12**: 101-4, 1980.

VAN STEEKELENBURG, N.A.M. Chemical control of *Didymella bryoniae* in cucumbers. Netherlands Journal of Plant Pathology, Wageningen, **84**: 27-34, 1978.

VAN STEEKELENBURG, N.A.M. Comparison of inoculation methods with *Didymella bryoniae* on *Cucumis sativus*. Euphytica, St. Joseph, **30**: 515-20, 1981.

VAN STEEKELENBURG, N.A.M. Factors influencing external fruit rot of cucumber caused by *Didymelbryoniae*. Netherlands Journal of Plant Pathology, Wageningen, **88**: 47-56, 1982.

VAN STEEKELENBURG, N.A.M. Epidemiological aspects of *Didymella bryoniae*, the cause of and fruit rot of cucumber. Netherlands Journal of Plant Pathology, Wageningen, **89**: 75-86, 1983.

VAN STEEKELENBURG, N.A.M. Influence of ventilation temperature and low ventilation rates on incidence of *Didymella bryoniae* in glasshouse cucumbers. Acta Horticulturae, Wageningen, **156**: 187-197, 1984.

VAN STEEKELENBURG, N.A.M. Influence of humidity on incidence of *Didymella bryoniae* on cucumber leaves and growing tips under controlled environmental conditions. Netherlands Journal of Plant Pathology, Wageningen, **91**: 277-283, 1985a.

VAN STEEKELENBURG, N.A.M. Influence of time transition from night to day temperatures regimes on incidence of *Didymella bryoniae* and influence of the disease on the growth and yield glasshouse cucumbers. Netherlands Journal of Plant Pathology, Wageningen, **91**: 225-233, 1985b.

VAN STEEKELENBURG, N.A.M. Factors influencing internal fruit rot of cucumber caused by *Didymella bryoniae*. Netherlands Journal of Plant Pathology, Wageningen, **92**: 81-91, 1986.

VAN STEEKELENBURG, N.A.M. Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in *Botrytis cinerea* and *Didymella bryoniae* in cucumbers in the Netherlands. Mededelingen van de Facultest Landbouwwetenschappen Rijhsuniversiteit Gent., Ghent, **52**(3a): 875-80, 1987. Apud Review of Plant Pathology, Wallingford, **68**: ref. 1918, 1989. (CD - CAB Abstracts 1987- 1989).

VAN STEEKELENBURG, N.A.M. Factors influencing the occurrence of stem lesions on tomato caused by *Didymella lycopersici* and chemical control of the disease. Mededelingen-van-de-Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit-Gent, Ghent, **53**(2b):651-6, 1988. Apud Review of Plant Pathology, Wallingfold, **68**: ref. 1918, 1989. (CD - CAB Abstracts 1987-1989).

VAN STEEKELENBURG, N.A.M. & VAN DE VOOREN, J. Influence of the glasshouse climate development of diseases in a cucumber crop with special reference to stem and fruit rot caused by *Didymella bryoniae*. Acta Horticulturae, Wageningen, **118**: 45-56, 1980.

VAN STEEKELENBURG, N.A.M.; WELLES, G.W.H. Influence of day/night humidity and cation ratios and concentration of nutrient solution on incidence of *Didymella bryoniae* in glasshouse cucumber. Netherlands Journal of Agricultural Science, Wageningen, **36**: 225-30, 1988.

VIDA, J.B.; SOUTO, E.R.; NUNES, W.M.C. Perdas causadas por *Mycosphaerella melonis* na cultura do melão em estufas plásticas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 26., Aracajú, 1993. Fitopatologia Brasileira, Brasília, **18**: 324, ago. 1993. Suplemento.

WIANT, J. *Mycosphaerella* black rot of cucurbits. Journal of Agricultural Research, Washington, 71(5): 193-213, 1945.

WILSON, C.L. & LAWRENCE, P.P. Potential for biological control of postharvest plant diseases. Plant Disease, St. Paul, 69: 375-9, 1985.

ZAMBRANO-PÉREZ, C.A. Efeito da luz e nutrição na reprodução de *Mycosphaerella melonis* (Pass.) Chiu & Walker. Piracicaba, 1972. 59p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/Universidade de São Paulo).

ZITTER, T.A. & HSU, L.W. Influence of temperature and fungicide on germination, growth, and virulence of *Ulocladium cucurbitae* on cucumber. Phytopathology, St. Paul, 82(3): 358-62, 1992.

ZIV, O. & ZITTER, T.A. Effects of bicarbonates and film-forming polymers on cucurbit foliar diseases. Plant Disease, 76: 513-17, 1992.