

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**PRODUÇÃO E PRESERVAÇÃO DE ESTRUTURAS DE RESISTÊNCIA DE
FUNGOS FITOPATOGÊNICOS HABITANTES DO SOLO**

CÉSAR JÚNIOR BUENO

Orientador: Prof. Dr. Nilton Luiz de Souza

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia – Área de Concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU – SP
Dezembro – 2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E
TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO
UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

B928p Bueno, César Júnior, 1973-
Produção e preservação de estruturas de resistência de
fungos fitopatogênicos habitantes do solo / César Júnior
Bueno. -- Botucatu, [s.n.], 2004.
xiii, 101 f. : il. color., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) -- Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrônômicas.
Orientador: Nilton Luiz de Souza.
Inclui bibliografia.

1. Fungos de solo 2. Metodologia. 3. Métodos de
produção. 4. Sclerotium. 5. Fungos - Preservação. I.
Souza, Nilton Luiz de. II. Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade
de Ciências Agrônômicas. III. Título.

CDD 632.4

Palavras-chave: Fungos do solo; Escleródios; Clamidósporos;
Métodos de preservação; Metodologia.

Aos meus pais **José Miguel Bueno** (*in memoriam*) e **Irene Paliari Bueno** pela educação, amor e incentivo que me são dedicados.

OFEREÇO

Aos meus irmãos, minha esposa **Jamilla Teixeira Pinto** e sua família

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Nilton Luiz de Souza** pela orientação na realização deste trabalho, pelos ensinamentos e amizade.

À **FAPESP** pela concessão da bolsa de estudo e pelo auxílio financeiro, através da Reserva Técnica, para a realização deste trabalho.

Aos **Professores e Funcionários** do Departamento de Produção Vegetal/Setor de Defesa Fitossanitária pelos ensinamentos, apoio e colaboração.

A **Prof^a. Dr^a. Silvia Renata Siciliano Wilcken** pela ajuda nas fotografias tiradas no microscópio ótico e no estereoscópico.

Ao **Prof^o. Dr^o. Carlos Roberto Padovani** na realização das análises estatísticas.

Aos **colegas** da pós-graduação do curso de Proteção de Plantas.

Aos amigos(as) **Adriana, Andréia, Aniello, Christiane, Gustavo, Janaína, Juliana, Maísa, Márcia, Michelle, Minoro, Natália, Pedrinha, Rafael, Ricardo, Rogério, Rosana, Roseli, Tank, Viviane e outros(as)** pela companhia, diversão, ajuda e incentivo.

À **Faculdade de Ciências Agrônomicas – UNESP – Botucatu/SP**, pela oportunidade concedida para a realização da minha pós-graduação.

Aos **funcionários** da Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônomicas pelo auxílio na revisão bibliográfica.

A todos que direta e indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	XI
1 RESUMO	1
2 SUMMARY	3
3 INTRODUÇÃO	5
4 REVISÃO DE LITERATURA	7
4.1 Fungos fitopatogênicos habitantes do solo estudados.....	7
4.1.1 <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> raça 2.....	7
4.1.2 <i>Macrophomina phaseolina</i>	8
4.1.3 <i>Rhizoctonia solani</i> GA 4 HGI.....	9
4.1.4 <i>Sclerotium rolfii</i>	10
4.1.5 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	11
4.1.6 <i>Verticillium dahliae</i>	12
4.2 Estruturas de resistência.....	13
4.3 Fitopatógenos cujas estruturas foram estudadas.....	14
4.3.1 <i>Fusarium oxysporum</i>	14
4.3.2 <i>Macrophomina phaseolina</i>	15
4.3.3 <i>Rhizoctonia solani</i>	17
4.3.4 <i>Sclerotium rolfii</i>	18
4.3.5 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	19
4.3.6 <i>Verticillium dahliae</i>	20
4.4 Métodos de preservação de fungos fitopatogênicos.....	21
4.4.1 Preservação dos fungos estudados.....	23
4.4.1.1 <i>Fusarium</i> spp.....	23
4.4.1.2 <i>Macrophomina phaseolina</i>	23
4.4.1.3 <i>Rhizoctonia solani</i>	23
4.4.1.4 <i>Sclerotium rolfii</i>	24
4.4.1.5 <i>Sclerotium sclerotiorum</i>	24
4.4.1.6 <i>Verticillium dahliae</i>	24

5 MATERIAL E MÉTODOS	25
5.1 Primeiro experimento.....	27
5.1.1 Produção de estruturas de resistência.....	27
5.1.1.1 <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> raça 2.....	27
5.1.1.2 <i>Macrophomina phaseolina</i>	27
5.1.1.3 <i>Rhizoctonia solani</i> GA4 HGI.....	27
5.1.1.4 <i>Sclerotium rolfsii</i>	28
5.1.1.5 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	28
5.1.1.6 <i>Verticillium dahliae</i>	28
5.2 Formação de estruturas de resistência dos fungos estudados nas metodologias desenvolvidas.....	29
5.2.1 <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> GA 4 HGI e <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> raça 2.....	29
5.2.2 <i>Verticillium dahliae</i>	29
5.2.3 <i>Macrophomina phaseolina</i>	29
5.3 Ensaio de campo.....	30
5.3.1 Avaliação da sobrevivência.....	31
5.3.1.1 <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> raça 2.....	31
5.3.1.2 <i>Macrophomina phaseolina</i>	31
5.3.1.3 <i>Rhizoctonia solani</i> GA 4 HGI.....	32
5.3.1.4 <i>Sclerotium rolfsii</i>	32
5.3.1.5 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	33
5.3.1.6 <i>Verticillium dahliae</i>	33
5.4 Sobrevivência e vigor das estruturas dos fungos nas diferentes temperaturas (Segundo experimento).....	34
5.4.1 Sobrevivência das estruturas e índice de vigor.....	35
5.5 Teste de patogenicidade.....	35
5.5.1 <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> raça 2.....	35
5.5.2 <i>Macrophomina phaseolina</i>	36
5.5.3 <i>Sclerotium rolfsii</i>	37

5.5.4 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	38
5.5.5 <i>Verticillium dahliae</i>	38
5.6 Análise estatística dos dados.....	39
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6.1 Formação de estruturas de resistência de cada fungo nas metodologias padronizadas.....	40
6.1.1 <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> raça 2.....	40
6.1.2 <i>Macrophomina phaseolina</i>	41
6.1.3 <i>Rhizoctonia solani</i> GA4 HGI.....	42
6.1.4 <i>Sclerotium rolfsii</i>	43
6.1.5 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	43
6.1.6 <i>Verticillium dahliae</i>	44
6.2 Sobrevivência das estruturas de cada fungo no campo e no laboratório.....	46
6.2.1 <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> raça 2.....	47
6.2.2 <i>Macrophomina phaseolina</i>	50
6.2.3 <i>Rhizoctonia solani</i> GA4 HGI.....	54
6.2.4 <i>Sclerotium rolfsii</i>	57
6.2.5 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	60
6.2.6 <i>Verticillium dahliae</i>	62
6.3 Sobrevivência e vigor das estruturas nas diferentes temperaturas.....	65
6.3.1 <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> raça 2.....	65
6.3.2 <i>Macrophomina phaseolina</i>	67
6.3.3 <i>Rhizoctonia solani</i> GA4 HGI.....	69
6.3.4 <i>Sclerotium rolfsii</i>	72
6.3.5 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	74
6.3.6 <i>Verticillium dahliae</i>	77
6.4 Teste de patogenicidade.....	79
6.4.1 <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> raça 2.....	79
6.4.2 <i>Macrophomina phaseolina</i>	81
6.4.3 <i>Sclerotium rolfsii</i>	82

6.4.4 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	83
6.4.5 <i>Verticillium dahliae</i>	84
7 CONCLUSÕES	88
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
01. Frasco utilizado para armazenar as estruturas produzidas nos diferentes métodos e submetidas à preservação em temperatura de geladeira, freezer e ambiente.....	34
02. Unidades formadoras de colônia desenvolvida por <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> raça 2 na superfície do meio de Komada a partir de clamidósporos produzidos em pó de talco.....	40
03. Microescleródios de <i>Macrophomina phaseolina</i> produzidos em substrato areno-orgânico e fotografados em microscópio estereoscópico com aumento de 40x (A); microescleródios de <i>Macrophomina phaseolina</i> produzidos em substrato areno-orgânico, retidos em peneira de 150µm, dispersos em lâmina com ágar-água e fotografados em microscópio ótico com aumento de 400x (B) e microescleródios de <i>Macrophomina phaseolina</i> produzidos em meio de BDA, retidos em peneira de 150µm, transferidos em lâmina com lactofenol e fotografados em microscópio ótico com aumento de 200x (C).....	41
04. Escleródios de <i>Rhizoctonia solani</i> produzidos em substrato areno-orgânico e fotografados em microscópio estereoscópico com aumento de 10x.....	42
05. Escleródios de <i>Sclerotium rolfsii</i> produzidos na superfície do meio de BDA+oxitetraciclina e fotografados em microscópio estereoscópico com aumento de 8x.....	43
06. Escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> produzidos em meio de fubá-feijão (A) e individualizados e fotografados em microscópio estereoscópico com aumento de 8x (B).....	44
07. Microescleródios de <i>Verticillium dahliae</i> produzidos em substrato areno-orgânico, retidos em peneira de 75µm, dispersos em lâmina com ágar-água e fotografados em microscópio ótico com aumento de 400x (A) e microescleródios de <i>Verticillium dahliae</i> produzidos em meio de BDA, transferidos em lâmina com lactofenol e fotografados em microscópio ótico com aumento de 400x (B).....	45

08. Precipitação diária registrada (em mm) no período do experimento.....	46
09. Sobrevivência de clamidósporos de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> raça 2 enterrados no campo e dos mantidos em condições de laboratório durante seis meses.....	47
10. Unidades formadoras de colônias em meio de Komada provenientes de clamidósporos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raça 2 em pó de talco.....	49
11. Sobrevivência de microescleródios de <i>Macrophomina phaseolina</i> enterrados no campo e dos mantidos em condições de laboratório durante seis meses.....	51
12. Colônias de <i>Macrophomina phaseolina</i> com formação de microescleródios em meio RB modificado a partir de estruturas do fungo em substrato areno-orgânico.....	52
13. Sobrevivência de escleródios de <i>Rhizoctonia solani</i> enterrados no campo e dos mantidos em condições de laboratório durante seis meses.....	54
14. Colônias de <i>Rhizoctonia solani</i> em meio de KHMP originadas a partir de escleródios do fungo em substrato areno-orgânico.....	55
15. Sobrevivência de escleródios de <i>Sclerotium rolfsii</i> livres enterrados no campo e dos mantidos em condições de laboratório durante seis meses.....	57
16. Colônias de <i>Sclerotium rolfsii</i> em meio de Batata Dextrose Ágar + oxitetraciclina originadas a partir de escleródios do fungo.....	58
17. Sobrevivência de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> livres enterrados no campo e dos mantidos em condições de laboratório durante seis meses.....	60
18. Colônias (cor amarela) de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em meio de Neon originadas a partir de escleródios do fungo.....	61
19. Sobrevivência de microescleródios de <i>Verticillium dahliae</i> enterrados no campo e dos mantidos em condições de laboratório durante seis meses.....	62

20. Colônias de *Verticillium dahliae* com formação de microescleródios nas bordas em meio de Ausher originidas a partir de estruturas do fungo em substrato areno-orgânico..... 63
21. Sobrevivência de clamidósporos de *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* raça 2 submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de avaliação..... 66
22. Sobrevivência de microescleródios de *Macrophomina phaseolina* submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de avaliação..... 67
23. Vigor das colônias de *Macrophomina phaseolina* crescidas a partir de microescleródios submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de avaliação..... 68
24. Sobrevivência de escleródios de *Rhizoctonia solani* submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de avaliação. 70
25. Vigor das colônias de *Rhizoctonia solani* crescidas a partir de escleródios submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de avaliação..... 71
26. Sobrevivência de escleródios de *Sclerotium rolfsii* submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de avaliação..... 72
27. Vigor das colônias de *Sclerotium rolfsii* crescidas a partir de escleródios submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de avaliação..... 73
28. Sobrevivência de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de avaliação..... 75
29. Vigor das colônias de *Sclerotinia sclerotiorum* crescidas a partir de escleródios submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de avaliação..... 76

30. Sobrevivência de microescleródios de *Verticillium dahliae* submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de avaliação..... 77
31. Vigor das colônias de *Verticillium dahliae* crescidas a partir de microescleródios submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de avaliação..... 78
32. 1- Mudanças de tomate do cultivar Kada inoculadas com esporos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2 preservado em talco e mantido em temperatura de geladeira; 2 – Mudanças de tomate do cultivar Kada inoculadas com esporos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2 preservado em talco e mantido em temperatura de freezer; 3 - Mudanças de tomate do cultivar Kada colocadas em água destilada (Testemunha)..... 80
33. 1 – Plantas de feijão do cultivar Carioquinha inoculadas com palitos de madeira colonizados por *Macrophomina phaseolina* preservado em substrato areno-orgânico e mantido em temperatura de geladeira; 2 – Plantas de feijão do cultivar Carioquinha introduzidas com palitos de madeira não colonizados por *Macrophomina phaseolina* (Testemunha)..... 81
34. 1 – Plântulas de feijão do cultivar Carioquinha cujas sementes foram colocadas em contato com escleródios de *Sclerotium rolfsii* preservados em temperatura ambiente; 2 – Plântulas de feijão do cultivar Carioquinha cujas sementes não foram colocadas em contato com escleródios de *Sclerotium rolfsii* preservados (Testemunha)..... 82
35. 1 – Plantas de feijão do cultivar Carioquinha inoculadas com palitos de madeira colonizados por *Sclerotinia sclerotiorum* mantida em temperatura de freezer; 2 – Plantas de feijão do cultivar Carioquinha inoculadas com palitos de madeira não colonizados pelo fungo (Testemunha)..... 83
36. 1- Mudanças de tomate do cultivar Kada inoculadas com esporos de *Verticillium dahliae* preservado em substrato areno-orgânico e mantido em temperatura de freezer; 2- Mudanças de tomate do cultivar Kada colocadas em água destilada (Testemunha)..... 84

LISTA DE TABELAS

Tabelas	Página
01. Informações dos fungos fitopatogênicos habitantes do solo estudados obtidos da micoteca da FCA/UNESP/Botucatu-SP.....	26
02. Análise química do solo do campo.....	31
03. Análise física do solo do campo.....	31
04. Mediana e valores mínimo e máximo da semi-amplitude interquartílica do número de colônias/g de talco de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> raça 2 que foi enterrado no campo e mantido em condições de laboratório por seis meses.....	48
05. Soma das frequências de sobrevivência (vivos e mortos) de microescleródios de <i>Macrophomina phaseolina</i> enterrados no campo e mantidos em condições de laboratório por seis meses.....	51
06. Soma das frequências de sobrevivência (vivos e mortos) de escleródios de <i>Rhizoctonia solani</i> enterrados no campo e mantidos em condições de laboratórios por seis meses.....	55
07. Soma das frequências de sobrevivência (vivos e mortos) de escleródios de <i>Sclerotium rolfsii</i> enterrados no campo e mantidos em condições de laboratório por seis meses.....	57
08. Soma das frequências de sobrevivência (vivos e mortos) de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> enterrados no campo e mantidos em condições de laboratório por seis meses.....	60
09. Soma das frequências de sobrevivência (vivos e mortos) de microescleródios de <i>Verticillium dahliae</i> enterrados no campo e mantidos em condições de laboratório por seis meses.....	62
10. Mediana e valores mínimo e máximo da semi-amplitude interquartílica do número de colônias/g de talco de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> raça 2 crescidas a partir de clamidósporos que foram submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de armazenagem.....	66

11. Soma das frequências de sobrevivência (vivos e mortos) de microescleródios de *Macrophomina phaseolina* armazenados por um ano em condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer..... 68
12. Mediana e valores mínimo e máximo da semi-amplitude interquartílica da soma das notas do índice de vigor das colônias de *Macrophomina phaseolina* crescidas a partir de microescleródios submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer..... 69
13. Soma das frequências de sobrevivência (vivos e mortos) de escleródios de *Rhizoctonia solani* armazenados por um ano em condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer..... 70
14. Mediana e valores mínimo e máximo da semi-amplitude interquartílica da soma das notas do índice de vigor das colônias de *Rhizoctonia solani* crescidas a partir de escleródios submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de armazenagem..... 71
15. Soma das frequências de sobrevivência (vivos e mortos) de escleródios de *Sclerotium rolfsii* armazenados por um ano em condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer..... 73
16. Mediana e valores mínimo e máximo da semi-amplitude interquartílica da soma das notas do índice de vigor das colônias de *Sclerotium rolfsii* crescidas a partir de escleródios submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de armazenagem..... 74
17. Soma das frequências de sobrevivência (vivos e mortos) de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* armazenados por um ano em condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer..... 75
18. Mediana e valores mínimo e máximo da semi-amplitude interquartílica da soma das notas do índice de vigor das colônias de *Sclerotinia sclerotiorum* crescidas a partir de escleródios submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de armazenagem..... 76
19. Soma das frequências de sobrevivência (vivos e mortos) de microescleródios de *Verticillium dahliae* armazenados por um ano em condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer..... 78

20. Mediana e valores mínimo e máximo da semi-amplitude interquartílica da soma das notas do índice de vigor das colônias de *Verticillium dahliae* crescidas a partir de microescleródios submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de armazenagem..... 79
21. Severidade da doença causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2 em plantas de tomateiro do cultivar Kada..... 80
22. Severidade da doença causada por *Macrophomina phaseolina* em plantas de feijão do cultivar Carioquinha..... 81
23. Severidade da doença causada por *Sclerotium rolfsii* em plântulas de feijão do cultivar Carioquinha..... 83
24. Severidade da doença causada por *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de feijão do cultivar Carioquinha..... 84
25. Severidade da doença causada por *Verticillium dahliae* em mudas de tomate do cultivar Kada..... 85

1 RESUMO

Os fungos fitopatogênicos habitantes de solo causam grandes perdas em culturas econômicas. Estes organismos, por produzirem estruturas de resistência na ausência de hospedeiros e/ ou condições climáticas desfavoráveis, inviabilizam o controle do patógeno. A preservação de fungos por longos períodos é importante para que pesquisas possam ser realizadas a qualquer tempo. O método de manutenção destes organismos requer que sejam conservados em baixa atividade biológica para preservar as características de esporulação e patogenicidade. O objetivo deste trabalho foi desenvolver metodologias para produzir, avaliar a sobrevivência e preservar as estruturas de resistência dos fungos *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* GA4 HGI, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Verticillium dahliae*. O primeiro experimento foi feito no delineamento de parcelas inteiramente casualizadas em que a sobrevivência das estruturas de resistência dos seis fungos foi avaliada mensalmente por seis meses, em condições de campo e de laboratório. Para tanto, estruturas de cada fungo, produzidas através das metodologias desenvolvidas, foram enterradas no campo a 10 cm de profundidade e outras mantidas no laboratório. O objetivo deste experimento foi verificar a eficiência das metodologias para manter e também para avaliar a capacidade da sobrevivência dos patógenos, permitindo desta forma, manusear as estruturas de resistência de todos os fungos estudados. No segundo experimento, frascos de 500 mL (duas repetições/fungo) contendo estruturas de resistência, produzidas através das

metodologias desenvolvidas, foram mantidos em temperatura natural de laboratório, de refrigeração (5°C) e de freezer (-20°C) para determinar a melhor condição para preservar as estruturas de cada fungo. Mensalmente, por um período de um ano, a sobrevivência e o vigor das colônias de cada patógeno foram avaliadas em meios de cultura específicos. Testes de patogenicidade foram realizados, após um ano de estocagem, com as estruturas que sobreviveram nos melhores tratamentos (temperatura) para cada fungo. No primeiro experimento, pode-se constatar que todas as metodologias desenvolvidas refletiram de forma positiva quanto à sobrevivência dos fungos no campo e na avaliação dessa característica em condições de laboratório. No segundo experimento, os melhores tratamentos para preservar os fungos foram: a) *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2 em temperatura de refrigeração ($5,2 \times 10^3$ ufc/g de talco) e de freezer ($2,9 \times 10^3$ ufc/g de talco); b) *M. phaseolina* e *S. rolfsii* em temperatura de refrigeração (100% de sobrevivência (S) e índice 3 de vigor (V)) e em temperatura ambiente (74,4%S e 1V), respectivamente e c) *S. sclerotiorum* e *V. dahliae*, ambos em temperatura de freezer (100%S e 3V). Quanto a patogenicidade, somente *V. dahliae* perdeu essa característica na metodologia desenvolvida, após um ano de preservação, sob as condições acima mencionadas.

PRODUCTION AND PRESERVATION OF RESISTANCE STRUCTURES OF SOILBORNE PHYTOPATHOGENIC FUNGI. Botucatu, 2004. 101f. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

Author: CÉSAR JÚNIOR BUENO

Adviser: NILTON LUIZ DE SOUZA

2 SUMMARY

Soilborne phytopathogenic fungi cause great losses in economical cultures. These organisms produce resistance structures in the absence of hosts and / or unfavorable climatic conditions. These structures, when presents, make unfeasible the pathogen control. The preservation of fungi for long periods is important to make possible researches the any time. The method of maintenance of these organisms requests that are conserved in low biological activity to preserve the sporulate characteristics and pathogenicity. The objective of this work was to develop methodologies to produce and to evaluate the survival and also to preserve the resistance structures of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 2, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* AG4 HGI, *Sclerotium rolfii*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Verticillium dahliae*. The first experiment was carried out in a randomized plots design where the survival of the resistance structures of the six fungi was monthly evaluated for six months under field and laboratory conditions. The structures of each fungus, produced through the developed methodologies, were buried in the field at 10 cm of depth and another maintained at the laboratory. The objective of this experiment was to verify the efficiency of the methodologies to maintain and also to evaluate the survival capacity of the pathogens in order to set methodologies to handle the resistance structures of those fungi. In the second experiment 500 mL flasks (two repetitions/fungus) containing resistance structure produced through developed methodologies were maintained at room, refrigerator and freezer temperature to determine the best condition to preserve the structures those pathogens. Monthly and for a period of

one year the survival and the vigour of each pathogen were evaluated on their specific medium. Pathogenicity tests were made after one year of stocking with the structures that survived in the best treatments (temperature) for each fungus. All the developed methodologies in the first experiment showed positive results related to survival of the fungi in the field as well as under lab conditions. In the second experiment the following temperature conditions showed to be adequate to preserve the fungi was: a) *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 2 at refrigerator temperature ($5,2 \times 10^3$ cfu/g of talc) and of freezer ($2,9 \times 10^3$ cfu/g of talc); b) *M. phaseolina* and *S. rolfsii* at refrigerator temperature (100% of survival (S) and index 3 of vigour (V)) and at room temperature (74,4%S and 1V), respectively and c) *S. sclerotiorum* and *V. dahliae* both at freezer temperature (100%S and 3V). As pathogenicity is concerned only *V. dahliae* lost that characteristic in the developed methodology after one year preserved under of the conditions above mentioned.

Keywords: sclerotium, microsclerotium, chlamydospores, protocols.

3 INTRODUÇÃO

Os fungos habitantes do solo causam grandes perdas em culturas econômicas. Estes organismos produzem estruturas de resistência na ausência de hospedeiros e/ou condições climáticas desfavoráveis. A presença destas estruturas inviabiliza o controle do patógeno.

A preservação de fungos é importante para que pesquisas possam ser realizadas com esses organismos a qualquer tempo. O método de preservação deve conservar as características originais dos fungos, tais como capacidade de esporular e patogenicidade. Isto pode ser mantido quando o método propicia a baixa atividade biológica dos microrganismos. As estruturas de resistência dos fungos fitopatogênicos permitem a sua sobrevivência por longos períodos no solo devido ao seu baixo metabolismo nesta condição.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver metodologias para produzir estruturas de resistência dos fungos *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* GA4 HGI, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Verticillium dahliae*, avaliar a sobrevivência destas estruturas em condições de laboratório e também preservá-las em temperatura adequada.

A produção, a avaliação da sobrevivência e a preservação das estruturas de resistência dos fungos fitopatogênicos habitantes do solo estudados, possibilitarão a realização de trabalhos de pesquisa, a qualquer tempo e local, eliminando a

necessidade de se trabalhar com plantas hospedeiras e de se encontrar áreas infestadas naturalmente com estes organismos.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 FUNGOS FITOPATOGÊNICOS HABITANTES DO SOLO ESTUDADOS

4.1.1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2

Fusarium oxysporum é um fungo mitospórico da classe-forma Hyphomycetes e os conídios são formados exógenamente em esporodóquios (Hawksworth et al., 1995). O fungo produz macroconídios hialinos, com cerca de 2 a 4 septos, de paredes finas e microconídios hialinos, elípticos, com 1 ou 2 células. *Fusarium oxysporum* produz clamidósporos, que são estruturas de resistência, de parede espessa e lisa, o que permite ao fungo sobreviver no solo por mais de 10 anos (Kurozawa & Pavan, 1997). As primeiras infecções do fungo no hospedeiro ocorrem na primavera, em decorrência da germinação dos clamidósporos que se encontravam dormentes no inverno (Amorim, 1995). Além do *Fusarium* sobreviver na forma de micélio ou de clamidósporos em restos culturais, o mesmo pode se desenvolver em várias espécies vegetais, que atuam como hospedeiras alternativas (Bedendo, 1995a).

Pelo menos duas raças fisiológicas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* já foram constatadas. Ocorre predominantemente a raça 1, mas a raça 2, em muitas regiões do mundo, tem aumentado de importância. A raça 1 deixou de ser importante devido ao lançamento de variedades de tomate resistentes (Kurozawa & Pavan, 1997).

O fungo causa murcha em todas as regiões onde o tomateiro é cultivado, sendo o motivo do deslocamento de áreas dedicadas ao cultivo dessa cultura (Kurozawa & Pavan, 1997). A murcha de *Fusarium* é conhecida no Brasil desde 1939 (Arruda, 1941). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* é favorecido por temperaturas entre 21 e 33°C, com ótimo em torno de 28°C. Este fungo manifesta-se no tomateiro predominantemente no início da floração ou na frutificação. Os sintomas da murcha de *Fusarium* são amarelecimento das folhas mais velhas, evoluindo para as mais novas. Os folíolos amarelos murcham e secam, mas as folhas ficam presas ao caule. Os vasos lenhosos tanto das folhas quanto do caule ficam com coloração parda e aparência seca. A penetração ocorre diretamente nas raízes ou por ferimentos, colonizando o sistema vascular. (Kurozawa & Pavan, 1997).

A única forma viável de controle da doença é o uso de cultivares resistentes (Silveira et al., 1967).

4.1.2 *Macrophomina phaseolina*

O fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich é um fitopatógeno bastante difundido, parasita mais de 500 espécies de plantas (Sinclair & Backman, 1989), notadamente culturas agronomicamente importantes e é o agente causal de podridões de raízes e caules. No Brasil, *M. phaseolina* causa problemas sérios em diversas culturas como algodão, caupi, feijão, gergelim, girassol, melão, milho, soja, entre outras (Kimati et al., 1997).

O patógeno foi relatado pela primeira vez em 1880 por Dhingra & Sinclair (1978) e no Brasil, detectado em 1935, em feijão comum, no município de Campinas/SP por Bittancourt (1935).

M. phaseolina é um fungo mitospórico, pertencente à classe-forma Coelomycetes, ordem-forma Sphaeropsidales (Hawksworth et al., 1995) e forma dois tipos de estruturas assexuais: picnídios e microescleródios (Viana, 1996). Na maioria dos vegetais parasitados, além do estágio de picnídio, observa-se microescleródios. Os microescleródios são de coloração marrom escuro a preto, desprovidos de casca, fortemente pigmentados, com aparência reticulada, estrutura homogênea, onde as células são de

paredes espessas com 1 a 3 núcleos, numerosas mitocôndrias, gotas de lipídios e outras organelas típicas das células. Os microescleródios são ainda globosos ou lenticulares e ficam sob a superfície do órgão afetado ou no interior dos tecidos parenquimatosos desorganizados (Viennot-Bourgin, 1949; Viana, 1996).

O patógeno sobrevive no solo como saprófita, em semente infectada, como micélio colonizando restos de cultura, em hospedeiros alternativos ou sob a forma de microescleródios (Dhingra & Sinclair, 1978). De acordo com Smith (1969), os microescleródios são os mais importantes propágulos para sobrevivência do fungo no solo por longos períodos.

O método mais prático e econômico para controlar a podridão causada por *M. phaseolina* seria através do uso de cultivares resistentes. No entanto, há hospedeiros que ainda não foram identificados níveis de resistência a esse patógeno (Ambrósio, 2003). De acordo com Kendig et al. (2000), uma alternativa de controle para *M. phaseolina* é interferir na biologia e na sobrevivência do patógeno, através de manejo do solo, promovendo ambiente inadequado para o desenvolvimento do fungo.

4.1.3 *Rhizoctonia solani* GA4 HGI

Rhizoctonia solani Kühn é um fungo necrotrófico, habitante do solo, que ataca um grande número de espécies vegetais em todo o mundo, causando, comumente, tombamento em plântulas e podridões de raiz e colo (Bueno, 2001). *Rhizoctonia solani* Kühn é classificado como um fungo mitospórico da classe-ordem Aganomycetes e ordem-forma Aganomycetales ou Micelia Sterillia (Hawksworth et al., 1995). No Brasil, este patógeno causa perdas consideráveis a várias espécies de plantas cultivadas comercialmente, como pimentão, seringueira, soja, amendoineiro e feijoeiro (Fenille, 1997).

A partir de conceitos recentemente utilizados, *R. solani* pode ser agrupada em 11 GA (grupo de anastomose) e 16 GIE (grupo intraespecífico), sendo considerada desta forma uma espécie complexa (Fenille, 1997). GA representa um grupo de isolados intimamente relacionados capazes de auto-reconhecimento através da fusão de hifas (anastomose). GIE representa um subgrupo de isolados dentro de um GA cuja fusão

de hifas é mais freqüente entre isolados do mesmo subgrupo ou, ainda possuem outras características particulares incluindo diferenças quanto à especificidade de gama de hospedeiros, utilização de nutrientes e diferenças genéticas baseadas em marcadores moleculares. A maioria dos GIE é genética e morfológicamente distinta uns dos outros (Cerezini & Souza, 1997).

R. solani é um fungo que apresenta grande habilidade e competitividade saprofítica no solo (Papavizas & Davey, 1959 e 1961; Garret, 1962; Davey & Papavizas, 1963) e, portanto, consegue sobreviver facilmente de um cultivo para o outro, colonizando restos de cultura. Entretanto, o que determina o período de sobrevivência do fungo são as condições ambientais (Kimati, 1980; Bell & Sumner, 1987). Além do fungo colonizar materiais orgânicos, este também sobrevive por longos períodos de tempo no solo, através de estruturas de resistência, denominados escleródios (Kimati, 1980).

O controle da doença causada por *R. solani* envolve medidas que visam diminuir o inóculo do patógeno (sementes sadias, tratamento de sementes, tratamento do solo e rotação de culturas), promover o rápido desenvolvimento da plântula (sementes de alto vigor, profundidade de plantio e aplicação adequada de nitrogênio) e evitar a ocorrência de determinadas condições ambientais que favoreçam a atuação do patógeno tais como plantios em áreas sujeitas a alagamento e irrigações excessivas. A utilização destas medidas é importante, pois inexitem variedades resistentes para esta doença em alguns hospedeiros (Bedendo, 1995c).

4.1.4 *Sclerotium rolfsii*

Sclerotium rolfsii é um fungo mitospórico da classe-forma Agonomycetes e ordem-forma Agonomycetales ou Micelia Sterillia (Hawksworth et al., 1995) por possuir micélio estéril (sem formação de esporos).

O fungo causa podridão em raízes, colo de plantas jovens e em sementes, danos em plântulas, folhas e frutos, em uma ampla gama de hospedeiros (Bedendo, 1995b; Farr et al., 1898). A doença causada por *S. rolfsii* se destaca nas regiões tropicais e subtropicais, onde temperaturas elevadas favorecem o crescimento e a sobrevivência do fungo, o que acarreta perdas consideráveis (Punja, 1985).

S. rolfii foi descrito pela primeira vez em 1892 (Aycock, 1966). Este fungo é polífago e caracteriza-se pela produção de micélio vigoroso e grampos de conexão nas hifas. O fungo produz escleródios globosos, pequenos, de 0,5-1,5 mm de diâmetro (Bianchini et al., 1997). Os escleródios originam de um enovelamento de hifas brancas que rapidamente se melanizam, resultando em uma coloração amarronzada (Aycock, 1966). O escleródio sobrevive no solo por no mínimo um ano. A sobrevivência do fungo ocorre através do micélio em matéria orgânica e também por escleródios presentes no solo. O escleródio germina entre 10-35°C mas com o aumento da profundidade do solo, ocorre uma diminuição na germinação. A faixa de pH ideal para a germinação está entre 2,6 e 4,4, mas pode ocorrer entre 2,6 e 7,7. A germinação dos escleródios é induzida também pela presença de compostos voláteis, que emanam de restos de cultura no solo, uma vez que o fungo necessita crescer saprofiticamente sobre substrato orgânico antes de atuar como patógeno. Água de irrigação, implementos agrícolas, esterco e sementes podem disseminar o fungo. *S. rolfii* pode penetrar diretamente no hospedeiro ou por ferimentos, geralmente próximo à superfície do solo (Bianchini et al., 1997).

O diagnóstico da doença é feito pelos sintomas na planta hospedeira (lesões marrons e aquosas no colo) e pelos sinais (crescimento micelial branco do fungo e formação de escleródios ao longo do tecido infectado) (Aycock, 1966).

O controle da doença é dificultado devido ao elevado número de hospedeiros, capacidade de competição saprofítica e número de escleródios produzidos e acumulados no solo em cada ciclo das culturas (Punja, 1985).

4.1.5 *Sclerotinia sclerotiorum*

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary está dentro do reino Fungi, phylum Ascomycota, classe Discomycetes, ordem Helotiales e família Sclerotiniaceae (Hawksworth et al., 1995). Esse fungo é de ampla ocorrência, tanto em locais de clima temperado quanto tropical, em regiões secas (áreas com irrigação) e em regiões úmidas. É um patógeno muito agressivo e causa sintomas em diversas partes da planta.

S. sclerotiorum já foi relatada em 75 famílias, 278 gêneros, 408 espécies e 42 subespécies ou variedades de plantas como hospedeiras, incluindo tanto plantas cultivadas como não cultivadas (Boland & Hall, 1994). No Brasil, o primeiro registro deste fungo ocorreu em 1921, em batata, no estado de São Paulo (Chaves, 1964).

S. sclerotiorum produz escleródios, que são estruturas de resistência do fungo, o que permite ao mesmo sobreviver no solo por cerca de 8 anos. Outra forma de sobrevivência do fungo é em condições de restos culturais. Em regiões de temperatura amena, com alta umidade, sob a superfície do solo e até no máximo 5 cm de profundidade, os escleródios podem germinar carpogenicamente dando origem a apotécios. Estes produzem ascósporos, sendo disseminados pelo vento e infectam determinados tecidos da planta hospedeira (Purdy, 1979). Segundo Steadman (1983), cerca de 10.000 a 30.000 ascósporos podem maturar simultaneamente em um único apotécio. Os sintomas e sinais característicos da doença são necrose aquosa do colo das plantas, crescimento cotonoso branco do micélio do fungo na superfície dos tecidos próximo ao lesionado e a presença de inúmeros escleródios pretos grandes (Kimati et al., 1997).

Para o controle deste patógeno deve-se adotar uma série de medidas tais como rotação de cultura com gramíneas, bom preparo do solo, evitar solos encharcados, irrigação excessiva e plantios adensados, uso de sementes sadias, incorporar restos culturais e fungicidas no solo e preventivamente na planta, dependendo do hospedeiro (Kimati et al., 1997).

4.1.6 *Verticillium dahliae*

O patógeno parasita cerca de 200 espécies de plantas entre solanáceas, malváceas, fabáceas e plantas de outras famílias, tanto cultivadas como silvestres.

Verticillium dahliae é um fungo mitósporico da classe-forma Hyphomycetes, ordem-forma Moniliales (Hawksworth et al., 1995) e os conídios são formados exógenamente em conidióforos livres. O fungo produz nos bordos das colônias, em meio de cultura, ramificações verticiladas, formando, em geral, três conidióforos a partir do mesmo ponto, em cujas extremidades são formados conídios unicelulares hialinos.

Nos micélios mais velhos são formados clamidósporos e microescleródios de cor marrom-escuro a pretos. Nestas condições, o fungo pode permanecer vivo por muitos anos no solo, mesmo na ausência do hospedeiro. Em condições de campo, o inóculo mantém-se indefinidamente porque o fungo tem muitos hospedeiros. O patógeno penetra diretamente pelas raízes ou por ferimentos, colonizando o xilema das plantas. O fungo desenvolve-se bem em temperaturas amenas (Kurozawa & Pavan, 1997). Os sintomas característicos deste patógeno no hospedeiro são amarelecimento em V com o vértice voltado para a nervura principal, descoloração do sistema vascular da região próxima ao colo e murchamento (Kimati et al. 1997).

O controle deste patógeno baseia-se no uso de variedades resistentes dependendo do hospedeiro, evitar plantio em solos onde já tenha sido constatada a doença, uso de sementes sadias, destruição de restos culturais e uso de solarização quando possível (Kimati et al. 1997).

4.2 Estruturas de resistência

Uma ou mais estratégias de sobrevivência foram desenvolvidas por cada agente fitopatogênico em seu ciclo evolutivo. Estas podem ser estruturas especializadas de resistência, atividades saprofiticas, plantas hospedeiras e vetores (Amorim, 1995). Fungos fitopatogênicos habitantes do solo apresentam como a principal forma de sobrevivência, em condições desfavoráveis, as estruturas especializadas de resistência. Teliósporos, ascocarpos, oósporos, escleródios e clamidósporos são exemplos de estruturas especializadas de resistência (Amorim, 1995).

Escleródios são agregados compactos de hifas somáticas formando massas geralmente arredondadas. Os escleródios podem apresentar tamanhos médios (*Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*) e diminutos (*Verticillium dahliae*, *Macrophomina phaseolina*). Estas estruturas podem também apresentar dimensões significativas (*Sclerotinia sclerotiorum*). A longevidade dos escleródios no solo varia dependendo do patógeno e do ambiente. Condições de alta umidade, reduzem a longevidade dos escleródios. A germinação dos escleródios pode ocorrer com emissão de hifas (miceliogênica; exemplos: *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium*

rolfsii), com formação de esporos (esporogênica; exemplo: *Verticillium dahliae*) ou com formação de corpos de frutificação (carpogênica; exemplo: *Sclerotinia sclerotiorum*). A germinação dos escleródios algumas vezes é induzida pela presença de exsudados do hospedeiro, o que permite ao fungo germinar na presença do hospedeiro e garantir sucesso na infecção (*S. rolfsii*). A germinação pode ocorrer de maneira sucessiva (*R. solani*, *S. sclerotiorum*) ou formando escleródios secundários a partir dos primários (*V. dahliae*), prolongando a sobrevivência dos fungos (Amorim, 1995).

Clamidósporo é um esporo constituído de uma única célula com um citoplasma condensado (acúmulo de reservas nutritivas) e uma espessa parede celular. Esta estrutura pode ser de formato oval ou oblonga e formada nas hifas de maneira intercalar ou terminal. Os clamidósporos podem ter origem ocasional de conídios ou ascósporos. Para *Fusarium*, o clamidósporo é a principal forma de sobrevivência do fungo no solo. As hifas e conídios deste fungo podem sofrer lise causada por microrganismos do solo, mas os clamidósporos sobrevivem a esta ação, permanecendo dormentes por longos períodos de tempo na ausência do hospedeiro (Amorim, 1995).

Além das estruturas especializadas de resistência, existem casos em que conídios, ascósporos, esporângios e rizomorfos aparecem como formas de sobrevivência dos fungos. Há grande variabilidade nas formas de sobrevivência dos fungos, assim como no tempo de permanência das estruturas no solo, implicando diretamente no controle das doenças (Amorim, 1995).

4.3 Trabalhos com estruturas de resistência envolvendo produção de inóculo, recuperação do solo, propiciando busca de alternativas de controle

4.3.1 Fusarium oxysporum

Blok (1997) produziu clamidósporos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *asparagi* através da indução da formação das estruturas em pó de talco. O método consiste em multiplicar o patógeno em extrato de malte líquido, centrifugar a suspensão e ressusender o micélio em água destilada esterilizada e colocar esta nova suspensão para secar em pó de talco. O objetivo do autor foi controlar as estruturas do fungo, em condições

fermentativas no solo, por meio da incorporação de material orgânico previamente ao uso da técnica de solarização. Para verificar a sobrevivência das estruturas, Blok (1997) efetuou diluição seriada de amostras (pó de talco + clamidósporos) em ágar-água a 0,1% seguido de plaqueamento de alíquotas em meio de Komada (Komada, 1975).

A sobrevivência e a dinâmica populacional de *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* foi verificada por Larkin et al. (1993). Para infestar o solo colocado em containeres, os autores primeiramente multiplicaram o patógeno em uma solução de sais minerais. Colocou-se a suspensão do fungo para infestar um solo, previamente autoclavado, por 4-8 semanas, com o objetivo de formar clamidósporos. Após produção das estruturas, infestou-se o solo dos containeres com 2×10^2 ufc (unidades formadoras de colônias)/g solo. Por um período de 6 meses, os autores coletaram amostras de solo dos containeres e através de diluição seriada e plaqueamento de alíquotas em meio de Komada, foi verificada a sobrevivência e a dinâmica populacional do fungo.

Minuto et al. (1995) primeiramente produziram inóculo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *clyclaminis* e dos seus antagonistas em pó de talco para avaliar o controle biológico e integrado da doença. O experimento foi feito em condições de casa-de-vegetação, aplicando o patógeno no substrato dos vasos com $1-3 \times 10^3$ ufc/g de talco e em seguida os antagonistas, em diferentes formas de aplicação, e dentre elas também em pó de talco. Os isolados antagônicos de *Fusarium* spp. aplicados na forma de clamidósporos dispersos em pó de talco controlaram *F. oxysporum* f. sp. *clyclaminis*.

Minuto et al. (1997) testaram isolados antagônicos de *Fusarium*, aplicados na forma de pó de talco (10^5 ufc/mL de substrato), para controlar a murcha de *Fusarium* de manjeriço, em condições de casa-de-vegetação. Dois isolados antagônicos (*F. oxysporum* e *F. moniliforme*) reduziram significativamente a incidência da murcha de *Fusarium* no manjeriço.

4.3.2 *Macrophomina phaseolina*

A influência de fatores físicos e da matéria orgânica na germinação de microescleródios de *M. phaseolina* só foi possível devido a produção de estruturas do fungo em placas de Petri com meio de BDA gelatinoso, obtendo posteriormente os

microescleródios de forma individualizada (Viana, 1996). Para observar a germinação dos microescleródios, estes foram colocados num sistema chamado de FAM, no qual há uma membrana de celulose onde as estruturas permanecem para poderem ser visualizadas em microscópio ótico.

O controle químico e biológico da podridão radicular do feijoeiro comum, causada por *M. phaseolina*, foi estudado por Cardoso et al. (1997). Em casa-de-vegetação, infestou-se o solo dos vasos com o patógeno multiplicado em arroz autoclavado.

Para avaliar a resistência de genótipos de feijão a *M. phaseolina*, em casa-de-vegetação, Coelho Neto & Dhingra (1996) produziram inóculo do fungo empregando o método de areia em mistura com farinha de milho a 2%. Uma camada de 1 mm sobre a superfície do solo dos vasos foi infestada para depois plantar os genótipos de feijão para serem avaliados.

Lodha et al. (1997) controlaram *M. phaseolina* com solarização e aquecimento natural do solo com incorporação de resíduos de crucíferas. O fungo foi multiplicado primeiramente em meio de *Prosopis juliflora*-Batata e após obter microescleródios individualizados, estes foram misturados em solo peneirado para ser infestado com as estruturas. Este solo infestado foi considerado o inóculo para colocar na área experimental. Para verificar a viabilidade dos microescleródios, amostras de solo foram coletadas e passadas por um conjunto de peneiras visando obter as estruturas, sendo em seguida, plaqueadas sobre o meio ágar-cloroneb-mercúrio-rosa bengal (Meyer et al., 1973).

Grande produção de microescleródios de *M. phaseolina* pode ser obtida em meio líquido de decocção de sementes de soja com adição de sacarose (Shurtleff & Averre III, 1997).

Olaya et al. (1996) determinaram a influência do potencial de água na sobrevivência de microescleródios de *M. phaseolina* no solo. A produção de estruturas do patógeno se deu no método de palito de madeira afixados em meio de BDA. Após formação dos microescleródios, os palitos foram armazenados em bolsas de náilon e enterrados no solo. Após submeter às estruturas em diferentes potenciais de água no solo, as bolsas foram recuperadas e os palitos submetidos a desinfestação superficial por 1 a 2

minutos em solução de hipoclorito de sódio a 1%. Em seguida, os microescleródios foram semeados em meio de BDA acidificado para verificar a viabilidade dos mesmos.

4.3.3 *Rhizoctonia solani*

Suguino & Maringoni (1995) analisaram o comportamento de variedades de feijoeiro a *R. solani* por meio da infestação artificial do solo com inóculo do patógeno produzido em arroz em casca autoclavado.

A sensibilidade térmica esclerocial de isolados de *R. solani* GA 4 HGI em banho maria, foi verificada por Silva et al. (1996), através da produção de escleródios do patógeno em vagens verdes de feijão em ágar água.

Michereff Filho et al. (1996) determinaram a influência de tipos de solo do estado de Pernambuco na intensidade da doença induzida por *R. solani* em feijoeiro. Inóculo do patógeno foi produzido em substrato de arroz descascado e autoclavado por 8 dias a 25°C com luz contínua. A seguir, infestaram os diversos tipos de solo na proporção de 50 mg do substrato, inoculando 1Kg de solo. A mistura foi realizada em bandejas plásticas e depois colocada nos vasos em casa-de-vegetação.

A determinação da temperatura letal de *R. solani* Kühn em banho-maria foi feito por Lefevre (1990), multiplicando inóculo do patógeno em substrato areno-orgânico.

Blok (1997) controlou *R. solani* GA 3 por indução das condições fermentativas do solo. Para tanto, multiplicou o inóculo do patógeno em perlita esterilizada embebida com uma solução contendo 1,5% de extrato de malte e 0,1% de peptona. A sobrevivência do patógeno foi verificada com plaqueamento de 16 perlitas sobre placa contendo ágar-água a 1,2% com oxitetraciclina. Após dois dias de crescimento, a germinação de hifas do fungo de cada perlita pode ser avaliada, utilizando uma escala de notas de 0-3. Em seguida, estes valores são colocados numa fórmula para obter o índice de germinação.

Keinath & Farnham (1997) avaliaram diferentes cultivares de plântulas de *Brassica oleracea* a *R. solani* tanto em casa-de-vegetação quanto em campo. Para tanto, produziram escleródios do patógeno em grãos verdes de feijão autoclavado

imersos em meio de BDA a 3%. Após produção de escleródios, estes foram separados, por diâmetro, em peneiras e, posteriormente, colocados no solo de vasos em casa-de-vegetação e no campo para a avaliação dos cultivares.

4.3.4 *Sclerotium rolfsii*

Infestação artificial de uma área experimental com *S. rolfsii*, multiplicado em arroz em casca autoclavado, foi feito por Ghini et al. (1997) com o objetivo de controlar o patógeno em feijoeiro através do uso da técnica de solarização.

Para avaliar o potencial de isolados de *Trichoderma* spp. no controle de *S. rolfsii* em feijoeiro, em casa de vegetação, Silveira et al. (1994) produziram inóculo do patógeno em grãos de arroz.

A influência do método de inoculação e da quantidade de inóculo de *S. rolfsii* na severidade da podridão do colo do feijoeiro foi verificada por Chaves & Costa (1999), produzindo escleródios do patógeno em hastes de feijão do cultivar Rosinha. O método consiste em colocar discos de meio de cultura contendo o fungo em segmentos de hastes de feijão autoclavados. A viabilidade dos escleródios foi verificada, após serem colocados no solo, por meio da desinfestação superficial destes em solução de hipoclorito de sódio seguido de plaqueamento em meio de Batata Dextrose Ágar (BDA).

Para testar o efeito de diferentes substratos vegetais na produção de escleródios de *S. rolfsii*, Matsumoto et al. (2000) observaram que o substrato composto por arroz autoclavado proporcionou a maior produção de estruturas do fungo.

Para determinar a temperatura letal de *S. rolfsii* em banho-maria, Lefevre (1990) produziu o inóculo do patógeno em substrato areno-orgânico.

O controle químico e biológico da podridão radicular do feijoeiro comum, causada por *S. rolfsii*, foi realizado por Cardoso et al. (1997). Este experimento foi realizado em casa-de-vegetação. O patógeno foi multiplicado no método de arroz em casca autoclavado para infestar o solo, utilizando 2 g de arroz colonizado no solo de cada vaso.

4.3.5 *Sclerotinia sclerotiorum*

Viana et al. (2000) verificaram o controle do tombamento de plântulas de feijoeiro causado por *S. sclerotiorum*, em casa-de-vegetação, multiplicando o fungo em substrato contendo 200 g de areia lavada + 5 g de quirera de milho + 40 mL de água destilada. Neste método, obtém-se escleródios que podem servir de inóculo. O solo da parte superior dos vasos foi infestado com 28 g do substrato.

O método de produção de escleródios de *S. sclerotiorum* em grãos de trigo autoclavados foi feito por Tokeshi et al. (1997), visando verificar o efeito de microrganismos benéficos sobre o patógeno.

Ferraz et al. (1998) estudaram a eficiência de meios de cultura a base de aveia, feijão, sorgo, cenoura, batata e cenoura+batata adicionados ou não com fubá para produção de escleródios e apotécios de *S. sclerotiorum in vitro* e constataram que o meio de feijão + fubá gerou o maior número de estruturas seguido pelo meio de batata + cenoura + fubá.

Nasser et al. (1995) desenvolveram um método de produção massal de escleródios de *S. sclerotiorum* que consiste em produzir as estruturas em cenouras autoclavadas. Neste método, 1,9 Kg de cenouras produzem 112 g de escleródios por bandeja de 40x30x6 cm.

Ferraz (2001) verificou o efeito de diferentes práticas culturais no manejo do mofo-branco (*S. sclerotiorum*) em feijoeiro. Para tanto, escleródios do fungo foram produzidos de acordo com o método de Ferraz & Café Filho (1996), em cenoura+fubá. Para determinar o potencial de controle das práticas culturais sobre o fungo, verificou-se a viabilidade dos escleródios enterrados no solo. Para isso, as estruturas removidas do solo passaram por uma lavagem com água destilada, assepsia por 3 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 1% e 3 minutos em álcool 50° com plaqueamento dos escleródios em meio de Neon.

A viabilidade de escleródios do fungo também pode ser constatada pelo seguinte método de Nasser et al. (1995) que descrevem um jato de água por cinco minutos nas estruturas, desinfestação superficial nas mesmas por um minuto com álcool 50°

e 3 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 1% com plaqueamento dos escleródios em meio de Neon.

4.3.6 *Verticillium dahliae*

Ghini et al. (1992) infestaram artificialmente uma área experimental com inóculo de *V. dahliae* multiplicado em milho pipoca para controlar a doença em berinjela, utilizando a técnica de solarização.

Blok (1997) controlou *V. dahliae* por indução de condições fermentativas do solo. O inóculo do patógeno foi obtido de caules de batata densamente cobertos com microescleródios, no qual foram transformados em pó. Este pó foi misturado em solo e colocados em bolsas de náilon para submeter às estruturas em diferentes tratamentos. A viabilidade das estruturas de *V. dahliae* foi verificada pelo método de peneiramento do inóculo sob água e ressuspensão das estruturas em ágar-água a 0,08% com plaqueamento de alíquotas sobre extrato de solo com ágar.

Franci et al. (1988) verificaram o efeito de três tipos de solo sobre a morte precoce da batateira causada pela associação dos agentes causais *V. dahliae* e *Pratylenchus penetrans*. Para tanto, produziram artificialmente inóculo do fungo. O método consiste na multiplicação do patógeno sobre um meio mínimo (Puhalla & Mayfield, 1974) coberto com papel celofane no escuro a 20-24°C por um mês. Após produção abundante de microescleródios sobre o papel celofane, as estruturas são recuperadas em peneiras com auxílio de um jato de água no papel celofane. Após recuperação, as estruturas são secas e colocadas em solo para infestá-lo. O solo mais microescleródios foi considerado o inóculo do patógeno para infestar o solo das microparcels experimentais. Amostras das microparcels foram coletadas, visando determinar o potencial de inóculo por meio de diluição seriada com plaqueamento de alíquotas em meio de álcool+estreptomina.

Bourbos & Skoudridakis (1996) estimaram a presença de *V. dahliae* no solo, antes e após a solarização, em condições de casa de vegetação, através da retirada de amostras do solo e diluição seriada destas com plaqueamento de alíquotas em meio de BDA+tetraciclina.

4.4 Métodos de preservação de fungos fitopatogênicos

A preservação de fungos fitopatogênicos por longos períodos de tempo é importante para que pesquisas possam ser realizadas a qualquer tempo. No entanto, o método de preservação precisa manter as características originais dos fitopatógenos, tais como capacidade de esporular e patogenicidade (Aparecido et al., 2001). Segundo Pimentel et al. (1980), essas características originais dos fungos fitopatogênicos têm importância na utilização para fins industriais, de ensino ou de pesquisa. Para preservar as características de esporulação e patogenicidade, Figueiredo & Pimentel (1975) relataram que os microrganismos precisam ter menor atividade biológica, diminuindo, assim, a possibilidade de ocorrer modificações genéticas, ou seja, prejudicar as características mencionadas.

Dhingra & Sinclair (1995) constataram que não existe nenhum método universal para armazenar patógenos de plantas, pois a seleção do método deve ser baseada na natureza do patógeno e nas vantagens e desvantagens de cada método.

Os principais métodos de preservação utilizados são uso de baixas temperaturas, nitrogênio líquido, sílica-gel, solo ou areia, tecidos secos do hospedeiro, repicagens periódicas, água destilada ou método de Castellani, liofilização e óleo mineral (Figueiredo & Pimentel, 1975; Aparecido et al., 2001).

Segundo Dhingra & Sinclair (1995), o método de repicagem periódica implica em consumo de tempo, pessoal e muitos fungos podem adaptar-se ao crescimento saprofítico, característica esta induzida pelo método que leva o organismo a perder a capacidade de esporular e a patogenicidade.

O método de preservação de culturas em óleo mineral, segundo esses autores, permite a armazenagem de fungos por longos períodos, mas como o fungo continua a crescer, variações na morfologia, fisiologia e esporulação podem ocorrer. Segundo Dhingra & Sinclair (1995), o método de óleo mineral não é muito indicado para *Fusarium*.

Alguns patógenos de plantas podem sobreviver por longos períodos quando secos em tecidos infectados do hospedeiro e armazenados em baixa umidade em um refrigerador (Dhingra & Sinclair, 1995).

O método Castellani é muito utilizado para fungos fitopatogênicos, consistindo em colocar colônias puras do fungo em um pequeno frasco contendo água destilada esterilizada ou solução salina, sendo posteriormente selado e armazenado em temperatura ambiente ou de refrigerador (Dhingra & Sinclair, 1995). Há relatos de muitos fungos (*Fusarium*, *R. solani*, *V. dahliae*) preservados pelo método de Castellani (Dhingra & Sinclair, 1995).

Recomenda-se o uso do método de armazenagem em sílica-gel, quando o método de liofilização ou nitrogênio não forem adequados. Para fungos fitopatogênicos, este método consiste em espalhar uma suspensão de esporos sobre sílica e armazená-la em temperatura ambiente ou em baixa temperatura. Há relato para várias espécies de *Fusarium* preservadas neste método, quando armazenadas a temperatura de 5°C com duração de 5 anos (Dhingra & Sinclair, 1995).

O método de armazenagem em solo tem sido trocado pelos métodos de liofilização ou nitrogênio líquido. O método de preservação de culturas em solo tem duas técnicas. A primeira consiste em utilizar solo estéril infestado com uma pequena quantidade de inóculo do patógeno sendo imediatamente seco e armazenado em refrigerador. Na segunda, o solo infestado com o microrganismo é incubado, permitindo, assim, o crescimento do fungo. Para *R. solani* e *Fusarium*, há relato do uso deste método com preservação por longos períodos de tempo, mas com modificações no método (Dhingra & Sinclair, 1995).

O método de congelamento, segundo Dhingra & Sinclair (1995), é usado somente para microrganismos que suportam temperaturas abaixo de freezer e que agüentam retornar para a temperatura ambiente.

O método de conservação em nitrogênio líquido é muito utilizado para fungos fitopatogênicos, pois a atividade metabólica dos microrganismos é muito baixa, o nitrogênio não é mutagênico e não influencia as características morfológicas e patogênicas (Dhingra & Sinclair, 1995). Assim como o método de preservação em nitrogênio líquido, o método de liofilização tem sido utilizado para armazenagem de microrganismos por longos períodos. Neste método, os patógenos ou suas estruturas perdem água e são armazenados na ausência de oxigênio e vapor de água (Dhingra & Sinclair, 1995).

4.4.1 Preservação dos fungos estudados

4.4.1.1 *Fusarium* spp.

Windels (1992) relatou que, para espécies de *Fusarium*, o melhor método de preservação por longos períodos é a liofilização. Desde 1978, o centro de pesquisa deste fungo, na Universidade do Estado de Pensilvânia, vem empregando esta técnica, sendo que das cerca de 16.000 culturas, todas ainda estão viáveis.

Um outro método citado por Windels (1992) para preservar espécies de *Fusarium* é o método de sílica-gel e nitrogênio líquido. Esse autor não recomenda para este fungo a preservação de culturas em solo esterilizado ou em BDA.

4.4.1.2 *Macrophomina phaseolina*

Mihail (1992) relatou que isolados de *Macrophomina* são preservados na forma de microescleródios sobre palitos de madeira. Após a colonização do patógeno no palito de madeira, este é colocado em placa de Petri estéril, selada e armazenada em temperatura ambiente. Neste método, há relato de preservação de isolados do fungo por cinco anos.

Outro método citado para preservação de *M. phaseolina* é o método de congelamento a -70°C (Mihail, 1992).

4.4.1.3 *Rhizoctonia solani*

Para *Rhizoctonia*, Carling & Sumner (1992) citaram a preservação do fungo por um ano em tubos contendo o meio de cultura BDA mantidos em temperatura ambiente. Segundo os autores, culturas deste patógeno não podem ser preservadas em temperatura de refrigerador ($0-7^{\circ}\text{C}$), devido à perda de viabilidade.

Cultura de *R. solani* pode ser preservada segundo Carling & Sumner (1992), utilizando o método de óleo mineral por 5 anos. Esses autores relatam que cultura deste fungo, em meio de BDA, não pode ser armazenada em temperatura de freezer

(-20°C) por motivo de perda de viabilidade e muitos isolados do fungo podem ser preservados por 10 anos ou mais em grãos.

Outro método citado por Carling & Sumner (1992) para preservar isolados de *R. solani* é o uso do método de nitrogênio líquido, mantendo culturas por 5-6 anos.

4.4.1.4 *Sclerotium rolfsii*

Punja & Rahe (1992) relataram a armazenagem de culturas de *S. rolfsii* por longos períodos de tempo (acima de 5 anos), utilizando o método de preservação em tubos de ensaio com o meio de BDA e adição de óleo mineral, sendo as culturas mantidas neste método a temperatura ambiente.

4.4.1.5 *Sclerotinia sclerotiorum*

O fungo pode ser preservado pelo método de repicagens por longos períodos na forma de escleródios, ascósporos e micélio. Os escleródios, após serem removidos de plantas doentes ou meio de crescimento, podem ser armazenados a temperatura de 2-5°C (Pratt, 1992).

4.4.1.6 *Verticillium dahliae*

Isolados de muitas espécies de *Verticillium*, segundo Melouk (1992), podem ser preservados a temperatura ambiente em tubos de ensaio com o meio de BDA por um ou dois anos. Colônia do fungo crescida em meio de BDA por 15 dias e seca com sulfato de cálcio por 72 horas a 22-25°C propicia a formação de microescleródios. Este pó é colocado em envelopes e armazenado em ambiente seco. Nesta condição, Melouk (1992) relata a preservação do fungo por dois anos ou mais.

Há relato também, segundo Melouk (1992), de preservação de culturas de *V. dahliae* em um mistura de solo autoclavado (solo, perlita e turfa) por vários anos em temperatura de 5°C.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nas dependências do Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA) da UNESP, Campus de Botucatu/SP.

Primeiramente, obteve-se um isolado patogênico de cada um dos seguintes fungos: *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen raça 2, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goindanich, *Rhizoctonia solani* Kühn GA 4 HGI, *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary e de *Verticillium dahliae* Kleb. (Tabela 1).

Tabela 1. Informações dos fungos fitopatogênicos habitantes do solo estudados obtidos da micoteca da FCA/UNESP/Botucatu-SP.

Patógeno	Nº. de registro	Cultura de isolamento	Local de origem	Forma de preservação
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> raça 2	TO 409	Tomate	Pati de Alferes – RJ	Solo / Temperatura ambiente
<i>Macrophomina phaseolina</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Feijão Carioca	Avaré – SP	Método de Castellani / Temperatura ambiente
<i>Rhizoctonia solani</i> GA4 HGI	SJ 13/96	Soja cv. Ocepar 16	Ponta Grossa-PR	Grãos de arroz / Temperatura de freezer
<i>Sclerotium rolfsii</i>	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Feijão	Embrapa-Jaguariúna/SP	Óleo mineral / Temperatura ambiente
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	SS06	Feijão	Rio Preto-DF	Óleo mineral / Temperatura ambiente
<i>Verticillium dahliae</i>	Emily 22/08	Tomate	-	Método de Castellani / Temperatura ambiente

Foram conduzidos dois experimentos principais. O primeiro foi instalado após desenvolver metodologias para produzir e para avaliar a sobrevivência de estruturas de resistência para cada fungo estudado em condições de laboratório. O objetivo desse ensaio foi avaliar a eficiência das metodologias quanto à sobrevivência das estruturas

no campo e no laboratório e, indiretamente, verificar a praticidade, rapidez e segurança na avaliação da germinação das estruturas de cada fungo, em condições de laboratório. O segundo experimento teve por objetivo determinar a melhor temperatura (temperatura natural de laboratório, de geladeira e de freezer) para preservar as estruturas dos fungos, por até um ano.

Os dois experimentos foram instalados na mesma época, utilizando mesmo inóculo, ou seja, das mesmas estruturas produzidas inicialmente para cada fungo.

5.1 Primeiro experimento

5.1.1 Produção de estruturas de resistência

5.1.1.1 *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2

Seguiu-se a metodologia de Blok (1997) com algumas modificações. A multiplicação do fungo deu-se em extrato de malte líquido por 7 dias, no escuro, a 25°C. Após crescimento, a suspensão foi colocada em uma bandeja de alumínio, sem haver necessidade de centrifugação, acrescentando-se pó de talco na proporção 2:1 (v/p) e deixando-se para secar em estufa de circulação forçada de ar a 26°C por 14 dias.

5.1.1.2 *Macrophomina phaseolina*

Utilizou-se metodologia semelhante à adotada para *R. solani*, diferindo apenas na temperatura de incubação do fungo que foi de 32°C.

5.1.1.3 *Rhizoctonia solani* Kühn GA 4 HGI

Adotou-se a metodologia de Lefevre (1990), que consiste em multiplicar o patógeno em substrato areno-orgânico, constituído de uma parte de esterco curtido, uma parte de areia fina lavada e seca e 2% de farelo de aveia. Adicionaram-se 20 mL de água destilada para cada 100 mL de substrato seco. Após duas autoclavagens de uma

hora a 120°C seguido de 24 horas de resfriamento, fragmentos de micélio do patógeno foram transferidos para o substrato, colocado em vidro, e incubado a 25°C, no escuro, por 14 dias.

5.1.1.4 *Sclerotium rolfsii*

A produção de escleródios foi efetuada com a colocação de uma estrutura do fungo sobre a superfície de uma “fina” camada do meio de BDA + 0,05 mg/mL de oxitetraciclina, incubado em estufa tipo BOD a 25°C, no escuro, por 30 dias.

5.1.1.5 *Sclerotinia sclerotiorum*

Seguiu-se, integralmente, a metodologia de Ferraz & Café Filho (1998), que consiste em embeber 100 g de feijão com água destilada por 12 horas. Após embebedimento, coloca-se o feijão em Erlenmeyers de 500 mL e acrescenta-se fubá na proporção de 20 g para 15 mL de água. Autoclavam-se os frascos por 20 minutos a 120°C e, após resfriamento, transferem-se discos de micélio do patógeno para o substrato feijão+fubá. Os frascos são mantidos em estufa tipo BOD regulada em temperatura de 26°C com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro por 30 dias. Após a produção de grande quantidade de escleródios, retira-se o substrato dos frascos de Erlenmeyer e passa-se por uma peneira com uma malha de 1 mm de abertura auxiliado por um jato forte de água de torneira, visando separar os escleródios dos grãos de feijão. Em seguida, os escleródios são deixados para secar por 24 horas a temperatura ambiente, em bandejas de alumínio, forradas com papel de jornal.

5.1.1.6 *Verticillium dahliae*

A produção de microescleródios deste patógeno seguiu metodologia semelhante à utilizada para *Rhizoctonia solani*, diferindo no tempo e temperatura de incubação do fungo que foram de 30 dias e 24°C, respectivamente.

5.2 Formação de estruturas de resistência dos fungos estudados nas metodologias desenvolvidas

5.2.1 *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* GA4 HGI e *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2

Foram fotografados, com microscópio estereoscópico, dotado de câmera fotográfica, os escleródios de *S. rolfsii* na superfície do meio de BDA+oxitetraciclina; os escleródios de *S. sclerotiorum* no substrato de feijão+fubá e os escleródios desse fungo livres deste substrato; os escleródios de *R. solani* em substrato areno-orgânico e as colônias de *Fusarium* originadas de clamidósporos, na superfície do meio de Komada.

5.2.2 *Verticillium dahliae*

Em microscópio ótico, dotado de câmera fotográfica, fotografou-se microescleródios do fungo, em substrato areno-orgânico. Para tal, processou-se o substrato areno-orgânico em liqüidificador com água destilada e a suspensão obtida foi passada por um conjunto de peneiras com o objetivo de recuperar os microescleródios formados. Em uma lâmina contendo uma fina camada de ágar-água foi colocada uma gota da suspensão contendo microescleródios retidos na peneira de 75µm. Foi feita uma lâmina com formação de microescleródios em meio de BDA mantido em estufa tipo BOD a temperatura de 22°C, por 20 dias para efeito de comparação com a formação das estruturas em substrato areno-orgânico.

5.2.3 *Macrophomina phaseolina*

Foram fotografados, em microscópio ótico, dotado com câmera fotográfica, os microescleródios do fungo, em substrato areno-orgânico. Para tal, processou-se o substrato areno-orgânico em liqüidificador com água destilada e a

suspensão obtida foi passada por um conjunto de peneiras com o objetivo de recuperar os microescleródios formados. Em uma lâmina contendo uma fina camada de ágar-água foi colocada uma gota da suspensão contendo microescleródios retidos na peneira de 150µm. Foi feita uma lâmina com formação de microescleródios em meio de BDA mantido em estufa tipo BOD a temperatura de 30°C por 7 dias para efeito de comparação com a formação das estruturas em substrato areno-orgânico.

5.3 Ensaio de campo

Este experimento foi instalado no campo do Departamento de Produção Vegetal da FCA/UNESP de Botucatu/SP.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído por 6 fungos, 7 épocas de avaliação (0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias, do início do experimento) e duas condições: campo e laboratório.

No campo, para cada época de avaliação, duas bolsas de náilon contendo estruturas de cada fungo foram identificadas e enterradas a 10 cm de profundidade no solo (Latosolo Vermelho Escuro fase arenosa – Tabelas 2 e 3) com espaçamento de 25 x 25 cm uma da outra.

No laboratório, foram mantidos dois frascos contendo as estruturas de cada fungo, sendo que para cada época de avaliação amostras eram removidas do mesmo frasco.

O parâmetro avaliado nas duas condições foi a sobrevivência dos fungos. No item 5.3.1 constam a forma de análise e réplicas feitas das amostras de cada fungo.

No campo, cada bolsa continha 15 g de pó de talco com clamidósporos para *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2; para *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum* 100 e 50 escleródios, respectivamente, e para *V. dahliae*, *R. solani* GA4 HGI e *M. phaseolina* cada bolsa continha 10 g de substrato areno-orgânico veiculando as estruturas.

O objetivo de se manter as estruturas enterradas por seis meses no solo foi dar oportunidade para que microrganismos habitantes do solo contaminassem as estruturas, de tal forma que elas fossem submetidas a condições adversas e sua recuperação,

sob essas condições, através dos métodos desenvolvidos, confirmasse a eficiência dos mesmos. Entretanto, não se objetivou determinar o período de longevidade dos fungos e sim a característica de sobrevivência nos períodos avaliados, uma vez que as estruturas de cada patógeno foram produzidas em laboratório.

Tabela 2. Análise química do solo do campo.

pH	M.O.	P resina	Mmol/dm³						V
CaCl₂	g/dm³	mg/dm³	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	%
4,6	14	3	25	0,4	9	2	12	37	32

Tabela 3. Análise física do solo do campo.

Areia total	Argila	Silte	Argila Natural	Textura do solo
81	19	0	-	Média ¹

¹Textura média: 0,5-0,25 mm.

5.3.1 Avaliação da sobrevivência

5.3.1.1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2

Seguiu-se a metodologia de Blok (1997) modificada, que consistiu em efetuar três diluições seriada (1:10) de uma amostra (pó de talco+clamidósporos – 10g) em solução salina (0,85% de NaCl) seguindo-se de plaqueamento de alíquotas (0,1mL) sobre o meio semi-seletivo de Komada (15 g peptona; 1 g K₂HPO₄; 0,5 g MgSO₄.7H₂O; 20 g ágar; 0,25 g cloranfenicol; 0,7 g PCNB e 1L água destilada). O PCNB foi adicionado somente após esterilização do meio (Komada, 1975). As estruturas foram mantidas em estufa tipo BOD a 26°C, no escuro, por 3-4 dias. Após a germinação das estruturas, efetuou-se a contagem das unidades formadoras de colônias (ufc) por grama de pó de talco. Foram feitas 4 repetições (placas) por amostra de cada bolsa e para cada uma das três diluições.

5.3.1.2 *Macrophomina phaseolina*

Procedeu-se a transferência do substrato areno-orgânico+microescleródios para uma nova bolsa de náilon e submeteu essas estruturas a

uma desinfestação superficial com as seguintes etapas: rápida imersão em álcool 70°, 20 segundos apenas em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e lavagens sucessivas em água destilada esterilizada. Transferiram-se porções do substrato+microescleródios para a superfície do meio semi-seletivo RB (Cloud et al., 1991) modificado (39 g de BDA, 224 mg i.a. de metalaxyl, 100 mg de rifampicina e 1 L de água destilada). As estruturas foram mantidas em estufa tipo BOD a 32°C, por 4-5 dias, no escuro. As estruturas com formação de colônia mais microescleródios (cor preta) foram contadas. Foram feitas 5 repetições (placas) por amostra de cada bolsa, sendo cada placa constituída por 10 porções do substrato+microescleródios.

5.3.1.3 *Rhizoctonia solani* GA4 HGI

Consistiu em transferir o substrato areno-orgânico+escleródios para uma nova bolsa de náilon com a desinfestação superficial passando pelas seguintes etapas: rápida imersão em álcool 70°, 5 segundos em solução de hipoclorito de sódio a 1% e lavagens sucessivas em água destilada esterilizada. Em seguida, foram transferidas porções do substrato+escleródios umedecidas com água destilada esterilizada para a superfície do meio semi-seletivo de KHMP (1 g KH_2PO_4 ; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g KCl; 0,01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,20 g NaNO_2 ; 0,05 g cloranfenicol, 20 g ágar; 0,05 g de sulfato de estreptomicina; 0,24 g metalaxyl; 0,005 g prochloraz e 940 mL água destilada). A estreptomicina e os fungicidas foram adicionados após a esterilização do meio (Ko & Hora, 1971). As estruturas foram mantidas em estufa tipo BOD a 26°C, no escuro, por 3-4 dias. Após a germinação das estruturas, em microscópio estereoscópico, efetuou-se a contagem das porções contendo hifas emergidas do patógeno coradas com lactofenol. Foram feitas 5 repetições (placas) por amostra de cada bolsa, sendo cada placa constituída por 10 porções do substrato+escleródios.

5.3.1.4 *Sclerotium rolfsii*

Os escleródios foram retirados da bolsa de náilon e submetidos a desinfestação superficial seguindo as seguintes etapas, de acordo com a metodologia

modificada de Resende & Zambolim (1986) para *Sclerotium cepivorum*: rápida imersão em álcool 70°, 1 minuto em solução de hipoclorito de sódio a 1,5% e lavagens sucessivas em água destilada esterilizada. Os escleródios desinfestados foram transferidos para a superfície do meio BDA + 0,05mg/mL de oxitetraciclina. As estruturas germinadas com micélio típico do patógeno foram contadas. Foram feitas 5 repetições (placas) por amostra de cada bolsa, sendo que cada placa continha 10 escleródios.

5.3.1.5 *Sclerotinia sclerotiorum*

Os escleródios foram transferidos da bolsa de náilon para uma peneira de 1mm de abertura seguido de uma lavagem com um jato de água de torneira por 5 minutos. Os escleródios lavados foram transferidos para uma nova bolsa de náilon e desinfestados superficialmente através dos seguintes passos: 1 minuto em álcool 50° e 3 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 1% (Nasser et al., 1995). Após desinfestação dos escleródios, estes foram transferidos para a superfície do meio de Neon [39 g BDA – após autoclavar o meio acrescentar: 150 mg de azul de bromofenol; 150 mg de penicilina G; 150 mg de sulfato de estreptomicina e 1L água destilada). O pH do meio deve ser ajustado para 4,7 (Nasser et al., 1995; Steadman et al., 1994)] e em seguida incubados em uma estufa tipo BOD a 18°C, no escuro, por até 6 dias. A viabilidade dos escleródios foi constatada pela mudança da cor do meio de azul para amarelo claro (Nasser et al., 1995). Foram feitas 5 repetições (placas) por amostra de cada bolsa, sendo cada placa constituída por 5 escleródios.

5.3.1.6 *Verticillium dahliae*

Consistiu em colocar o substrato+microescleródios em uma nova bolsa de náilon e mergulhar em água destilada esterilizada, visando umedecer o substrato e facilitar a transferência de porções para a superfície do meio semi-seletivo de Ausher (5,0 g etanol; 7,5 g sacarose; 2,0 g NaNO₃; 0,5 g KCl; 0,5 g MgSO₄.7H₂O; 1,0 g K₂HPO₄; 0,01 g FeSO₄.7H₂O; 0,05 g PCNB; 0,1g sulfato de estreptomicina; 0,25g cloranfenicol e 1L água destilada). O PCNB e a estreptomicina foram adicionados após a esterilização do meio

(Ausher et al., 1975). As estruturas foram mantidas, inicialmente, em estufa tipo BOD a 18°C, no escuro, por 3-4 dias. Após a germinação das estruturas, efetuou-se a contagem das porções contendo hifas emergidas do patógeno. Posteriormente, as estruturas foram mantidas na estufa tipo BOD, na mesma temperatura, até 30 dias, onde aparece a formação de microescleródios em torno das colônias, aferindo a avaliação. Foram feitas 5 repetições (placas) por amostra de cada bolsa, sendo cada placa constituída por 10 porções do substrato+microescleródios.

5.4 Sobrevivência e vigor das estruturas dos fungos nas diferentes temperaturas (Segundo Experimento)

O armazenamento das estruturas foi feito em frasco de 500mL, com duas repetições por patógeno (Figura 1), sendo cada frasco mantido em temperatura de freezer (-20°C), de geladeira (5°C) e em temperatura natural de laboratório.

Mensalmente e, por um período de um ano, avaliou-se a sobrevivência das estruturas e o seu vigor. A avaliação da sobrevivência das estruturas dos patógenos estudados foi feita sempre retirando amostras dos mesmos frascos submetidos às três temperaturas.

Os frascos foram colocados nos três ambientes de maneira inteiramente casualizada. Aqueles mantidos na temperatura natural de laboratório foram colocados em armário de aço.



Figura 1. Frasco utilizado para armazenar as estruturas produzidas nos diferentes métodos e submetidas à preservação em temperatura de geladeira, freezer e ambiente.

5.4.1 Sobrevivência das estruturas e Índice de vigor

A avaliação da sobrevivência de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2, *M. phaseolina*, *R. solani* GA 4 HGI, *S. rolfsii*, *S. sclerotiorum* e de *V. dahliae* seguiu a mesma metodologia descrita no item 5.3.1 para cada fungo.

Quanto ao vigor, as colônias desenvolvidas a partir das estruturas foram avaliadas de acordo com a seguinte escala de notas:

- 0 – ausência de germinação;
- 1 – germinação de algumas estruturas;
- 2 – germinação de todas as estruturas com micélio pouco vigoroso;
- 3 – germinação de todas as estruturas com micélio vigoroso, mantendo as características de esporulação e de aparecimento de estruturas de resistência.

5.5 Teste de patogenicidade

Após um ano de avaliação do segundo experimento, realizou-se teste de patogenicidade das estruturas de cada patógeno que sobreviveram no melhor tratamento (temperatura). Efetuou-se o reisolamento do agente causal das plantas de cada tratamento para completar o Postulado de Kock.

5.5.1 *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2

O fungo preservado no melhor tratamento durante um ano foi recuperado em meio de BDA+oxitetraciclina e repicado, posteriormente, em meio líquido de Tochinai por 5 dias a 28°C (Pavan & Kurozawa, 1981). Seguiu-se a metodologia de inoculação descrita por Pavan & Kurozawa (1981) em mudas de tomate do cultivar Kada, com 21 dias de idade. As mudas foram arrancadas e as raízes lavadas com água de torneira e, em seguida, mergulhadas numa suspensão com 10^5 esporos/mL por 5 minutos e plantadas imediatamente.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 3 tratamentos (geladeira, freezer e testemunha) e com 5 repetições. A parcela (repetição) foi constituída por um vaso contendo 3 plantas. O tratamento testemunha consistiu de plantas imersas em água destilada.

As plantas foram mantidas a temperatura de 28°C, com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro e em condições de estufa tipo BOD. Após 25 dias da inoculação, as plantas foram avaliadas de acordo com a escala de notas descrita por Cerezini (1989) como segue:

- 0 – plantas sadias sem sintomas externos ou internos no caule cortado na altura do primeiro internódio logo acima dos cotilédones;
- 20 - vasos coloridos na região do primeiro internódio sem outros sintomas visíveis;
- 40 - vasos coloridos até a altura da primeira folha com pelo menos um folíolo com amarelecimento;
- 60 - vasos coloridos até a metade do comprimento do caule, com duas ou mais folhas com amarelecimento;
- 80 - vasos coloridos até próximo ao ponteiro e maioria das folhas murchas com exceção do ponteiro;
- 100 - plantas mortas ou com vasos coloridos e folhas murchas até o ponteiro.

5.5.2 *Macrophomina phaseolina*

O fungo preservado no melhor tratamento durante um ano foi recuperado em meio RB modificado e, posteriormente, transferido para placas de Petri contendo palitos de dentes autoclavados inseridos em meio de BDA.

Segundo a metodologia descrita por Coelho Netto & Dhingra (1996), após a colonização dos palitos, estes foram levemente introduzidos no caule, acima da superfície do solo, de plantas de feijão do cultivar Carioquinha, com formação da primeira folha verdadeira.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 2 tratamentos (geladeira e testemunha) e com 5 repetições. A parcela (repetição) foi

constituída por um vaso contendo 3 plantas. O tratamento testemunha consistiu de plantas inoculadas com palitos de dentes sem estarem colonizados pelo fungo.

As plantas foram mantidas a temperatura de 30°C, com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro e em condições de estufa tipo BOD. Após 6 dias da inoculação, as plantas foram avaliadas de acordo com a escala de notas descrita por Coelho Netto & Dhingra (1996) como segue:

- 1 - sem sintoma ao redor do ponto de inoculação;
- 2 - halo escuro ao redor do ponto de inoculação;
- 3 - comprimento da lesão menor que 0,5 cm;
- 4 - idem ao 3 com lesão de 1 cm;
- 5 - idem ao 3 com lesão entre 1 para 2 cm;
- 6 - idem ao 3 com lesão entre 2 para 4 cm;
- 7 - idem ao 3 com lesão entre 4 para 6 cm ou sem limite definido ou com pouco picnídio na base da lesão;
- 8 - comprimento da lesão com mais de 6 cm ou lesão sem limite definido com número de picnídios próximos à base do caule;
- 9 - caule com cor cinzenta e coberto com muitos picnídios.

5.5.3 *Sclerotium rolfsii*

Os escleródios de *S. rolfsii* livres e preservados no melhor tratamento por um ano foram recuperados em meio de BDA+oxitetraciclina.

Seguiu-se a metodologia de inoculação descrita por Matsumoto et al. (1999). Em um substrato composto por solo, areia e esterco na proporção de 3:1:1 (v/v/v), colocou-se em contato com sementes de feijão do cultivar Carioquinha 2 escleródios, sendo, em seguida, cobertos com uma camada de 2 cm de areia lavada.

O delineamento empregado foi inteiramente casualizado, com 2 tratamentos (ambiente e testemunha) e 5 repetições. A parcela (repetição) foi constituída por um vaso contendo 3 sementes com dois escleródios cada. O tratamento testemunha consistiu de vasos com sementes mas sem escleródios.

As plantas foram mantidas a temperatura de 28°C, com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro e em condições de estufa tipo BOD. As plantas foram avaliadas de acordo com a escala de notas de Matsumoto et al. (1999):

- 0 - plântulas sadias e sem sintomas de necrose no colo;
- 1 - plântulas com necrose do solo;
- 2 - tombamento de pré e pós-emergência.

5.5. 4 *Sclerotinia sclerotiorum*

Os escleródios de *S. sclerotiorum* livres e preservados no melhor tratamento por um ano foram recuperados em meio de Néon.

Seguiu-se a metodologia de inoculação descrita por Ferraz (1996). Após crescimento do fungo, discos de micélio foram transferidos para o meio de BDA com inserção de palitos de dente autoclavados. Após 7 dias de colonização dos palitos, plantas de feijão do cultivar Carioquinha, com formação da primeira folha verdadeira, foram inoculadas no caule.

O delineamento empregado foi inteiramente casualizado, 2 tratamentos (freezer e testemunha) e 5 repetições. A parcela (repetição) foi constituída por um vaso contendo 3 plantas. O tratamento testemunha consistiu de plantas inoculadas com palitos sem estarem colonizados pelo fungo.

As plantas foram mantidas, em condições de câmara úmida, por 72 horas a temperatura de 26°C em estufa tipo BOD. As plantas foram avaliadas quanto a extensão da lesão escura (cm) a partir do ponto de inoculação.

5.5.5 *Verticillium dahliae*

O fungo preservado no melhor tratamento por um ano foi recuperado em meio de Ausher. Após crescimento, discos de meio de cultura contendo micélio do fungo foram repicados para o meio de BDA e mantidos em estufa tipo BOD a temperatura de 24°C por 5 dias.

Para a realização do teste de patogenicidade, seguiu-se a metodologia de inoculação descrita por Cerezine (1989). Mudanças de tomate do cultivar Kada (com 15 dias de idade) foram arrancadas, lavadas com água de torneira e as raízes podadas. As raízes das mudas foram colocadas numa suspensão de conídios (10^6 esporos/mL) por 15 minutos.

O delineamento empregado foi inteiramente casualizado, com 2 tratamentos (freezer e testemunha) e 5 repetições. A parcela (repetição) foi constituída por um vaso contendo 3 plantas. O tratamento testemunha consistiu de mudas com raízes podadas imersas em água destilada por 15 minutos.

As plantas foram mantidas a temperatura de 24°C, com fotoperíodo de 10 horas de luz e 14 horas de escuro e em condições de estufa tipo BOD. As plantas foram avaliadas 30 dias após a inoculação, de acordo com a escala de notas descrita por Cerezine (1989) para o fungo *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2.

5.6 Análise estatística dos dados

No primeiro e segundo experimento, realizou-se análise não-paramétrica de Mann-Whitney (para 2 e 3 níveis de tratamentos) do número de colônias de *Fusarium*, complementada com as comparações múltiplas (Siegel & Castellan Jr., 1988).

Em relação à frequência total de sobrevivência (demais dados do primeiro e segundo experimento), utilizou-se o teste de Goodman (1964) para contrastes entre e dentro de populações multinomiais (no caso binomiais, sendo considerado como sucesso à presença (vivo) e fracasso a ausência (morto)) dos fungos.

A análise dos dados do vigor das colônias do segundo experimento foi realizada também pela técnica não-paramétrica de Kruskal-Wallis, complementada com as comparações múltiplas entre pares de ambientes (Norman & Streiner, 1994).

Todas as comparações foram realizadas a nível de 5% de significância.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Formação de estruturas de resistência de cada fungo nas metodologias desenvolvidas

6.1.1 *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2

A metodologia utilizada foi eficiente para produção de clamidósporos, uma vez que se observa colônia desenvolvida a partir das estruturas (Figura 2).



Figura 2. Unidades formadoras de colônia desenvolvidas por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2 na superfície do meio de Komada a partir de clamidósporos produzidos em pó de talco.

Vale ressaltar que a produção de clamidósporos de *Fusarium* em pó de talco é a maneira mais fácil de transportar essas estruturas de resistência para o solo, tendo sido essa metodologia muito utilizada (Blok, 1997; Minuto et al., 1995 e 1997). No

presente trabalho, procurou-se fazer alterações na referida metodologia para tornar mais simples a produção destas estruturas.

Larkin et al. (1993) produziram estruturas deste fungo inicialmente em uma solução de sais minerais para depois transferir para o solo e com isso obter o inóculo para realizar quaisquer trabalhos, enquanto Windels (1992) já as conseguiram em meio de cultura acrescido de glicose ou de carbonato de magnésio.

6.1.2 *Macrophomina phaseolina*

O substrato areno-orgânico (Lefevre, 1990) induz a formação de microescleródios de *M. phaseolina* (Figura 3).

Não há relato na literatura sobre a utilização do substrato areno-orgânico para produção das estruturas de resistência de *M. phaseolina*, assim como para *V. dahliae*. O manuseio das estruturas de resistência de *M. phaseolina* e a realização de trabalhos com os microescleródios tornam-se fácil com a metodologia desenvolvida.

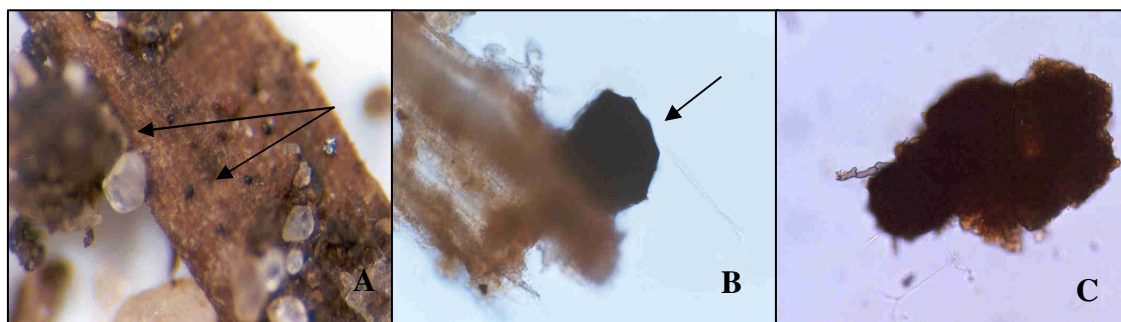


Figura 3. Microescleródios de *Macrophomina phaseolina* produzidos em substrato areno-orgânico e fotografados em microscópio estereoscópico com aumento de 40x (A); microescleródios de *Macrophomina phaseolina* produzidos em substrato areno-orgânico, retidos em peneira de 150 μ m, dispersos em lâmina com ágar-água e fotografados em microscópio ótico com aumento de 400x (B) e microescleródios de *Macrophomina phaseolina* produzidos em meio de BDA, retidos em peneira de 150 μ m, transferidos em lâmina com lactofenol e fotografados em microscópio ótico com aumento de 200x (C).

Olaya et al. (1996) realizaram trabalhos com microescleródios de *M. phaseolina* produzindo estas estruturas em palito de madeira inserido em meio de BDA. Cardoso et al. (1997) produziram inóculo do fungo em arroz autoclavado, enquanto Coelho

Netto & Dhingra (1996) e Mihail (1992) em areia + farinha de milho. Grande produção de microescleródios do fungo pode ser obtida em meio de BDA gelatinoso (Viana, 1996), em meio de *Prosopis juliflora*-Batata (Lodha et al., 1997) e em meio líquido de sementes de soja + sacarose (Shurtleff & Averre III, 1997).

6.1.3 *Rhizoctonia solani* GA4 HGI

A metodologia utilizada possibilitou a produção de escleródios de *R. solani* (Figura 4), conforme resultado semelhante obtido por Lefevre (1990).

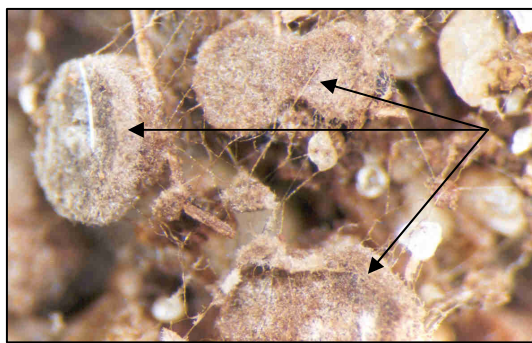


Figura 4. Escleródios de *Rhizoctonia solani* produzidos em substrato areno-orgânico e fotografados em microscópio estereoscópico com aumento de 10x.

Escleródios deste patógeno podem ser produzidos também em arroz em casca autoclavado (Suguino & Maringoni, 1995; Michereff Filho et al., 1996), em grãos verdes de feijão autoclavados (Silva et al., 1996; Keinath & Farnham, 1997), em pedaços de casca de amendoim e sementes com adição de sacarose (Carling & Sumner, 1992) e em perlita esterilizada embebida com extrato de malte + peptona (Blok, 1997).

6.1.4 *Sclerotium rolfii*

A metodologia utilizada permitiu a produção de escleródios após 30 dias de incubação do fungo (Figura 5). Além disso, as estruturas (Figura 5) podem ser facilmente removidas da superfície do meio para serem manipuladas individualmente.



Figura 5. Escleródios de *Sclerotium rolfii* produzidos na superfície do meio de BDA+oxitetraciclina e fotografados em microscópio estereoscópico com aumento de 8x.

Mihail & Alcorn (1984) relataram também a utilização do meio de BDA, mas sem adição de antibiótico para produção de escleródios do fungo.

Para este patógeno, há relatos também de produção de escleródios em grãos de arroz (Ghini et al., 1997; Silveira et al., 1994; Matsumoto et al., 2000; Cardoso et al., 1997), em hastes de feijão do cultivar Rosinha (Chaves & Costa, 1999) e em substrato areno-orgânico (Lefevre, 1990).

6.1.5 *Sclerotinia sclerotiorum*

A metodologia empregada (Ferraz & Café Filho, 1998) permitiu a produção de escleródios do fungo, que podem ser facilmente individualizados e manuseados (Figura 6 A e B).

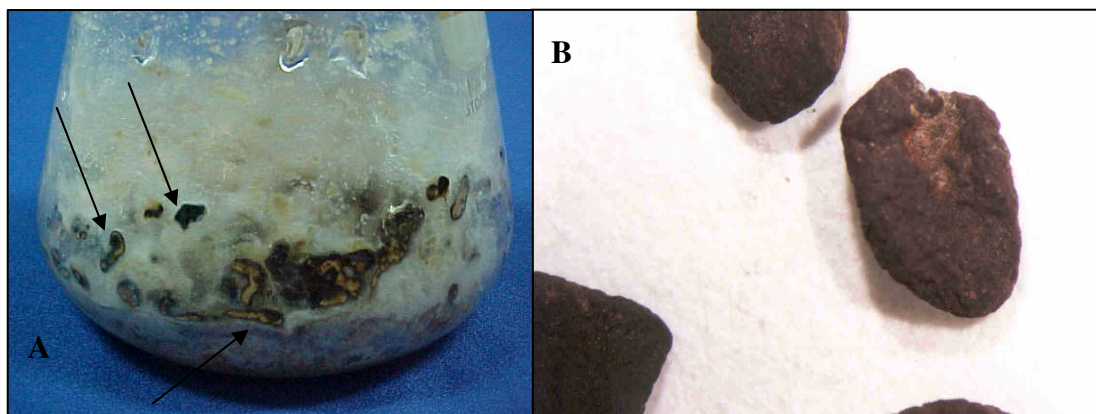


Figura 6. Escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* produzidos em meio de fubá-feijão (A) e individualizados e fotografados em microscópio estereoscópico com aumento de 8x (B).

Nasser et al. (1995) relataram grande produção de escleródios deste fungo em cenouras autoclavadas, enquanto Tokeshi et al. (1997) e Viana et al. (2000) verificaram produção das estruturas do fungo em grãos de trigo e em substrato contendo areia + quirera de milho, respectivamente. Pratt (1992) também citou a produção de escleródios de *S. sclerotiorum* utilizando substrato orgânico com feijão, vagem, pecíolos, discos de cenoura e pequenos grãos autoclavados em placa de Petri ou em frascos.

Em testes preliminares, observou-se que a veiculação das estruturas deste fungo juntamente com grãos pode implicar em contaminação com nematóides, gerando com isso resultados inconsistentes de sobrevivência do fungo. Portanto, independente do método utilizado para produção das estruturas, as mesmas devem ser transportadas e colocadas no solo de maneira individualizada.

6.1.6 *Verticillium dahliae*

A metodologia utilizada permitiu a produção de microescleródios do fungo (Figura 7) no método adaptado de Lefevre (1990), assim como descrito anteriormente para *M. phaseolina*.

Não há relato na literatura sobre a utilização do substrato areno-orgânico para produção de estruturas deste fungo. O manuseio das estruturas de resistência

deste fungo e a realização de trabalhos com microescleródios tornam-se fácil com a metodologia desenvolvida.

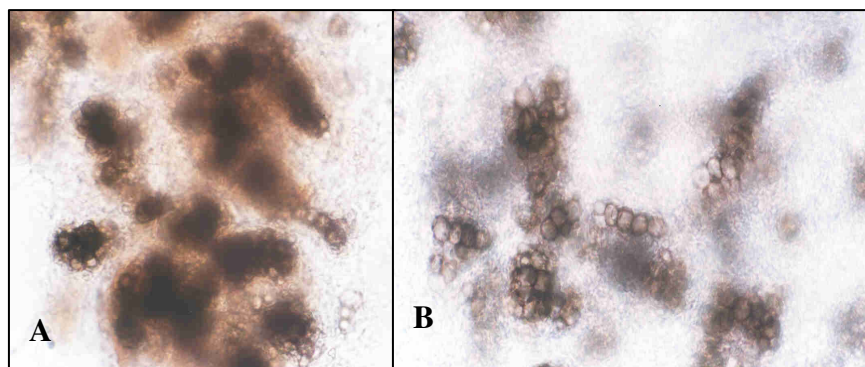


Figura 7. Microescleródios de *Verticillium dahliae* produzidos em substrato areno-orgânico, retidos em peneira de 75 μ m, dispersos em lâmina com ágar-água e fotografados em microscópio ótico com aumento de 400x (A) e microescleródios de *Verticillium dahliae* produzidos em meio de BDA, transferidos em lâmina com lactofenol e fotografados em microscópio ótico com aumento de 400x (B).

Blok (1997) obteve produção de microescleródios de *V. dahliae* por meio de trituração de caules de batata densamente cobertos com as estruturas, enquanto Francl et al (1988) obteve as mesmas estruturas através da produção destas inicialmente em um meio mínimo para depois transferí-las para o solo e com isso obter inóculo para realização de trabalhos.

Ghini et al. (1992) para testar a técnica de solarização visando controlar *V. dahliae* em campo, infestaram artificialmente uma área experimental com inóculo do fungo produzido em milho pipoca.

6.2 Sobrevivência das estruturas de cada fungo no campo e no laboratório

A precipitação registrada no período do experimento, que foi de março a setembro de 2002, consta na Figura 8.

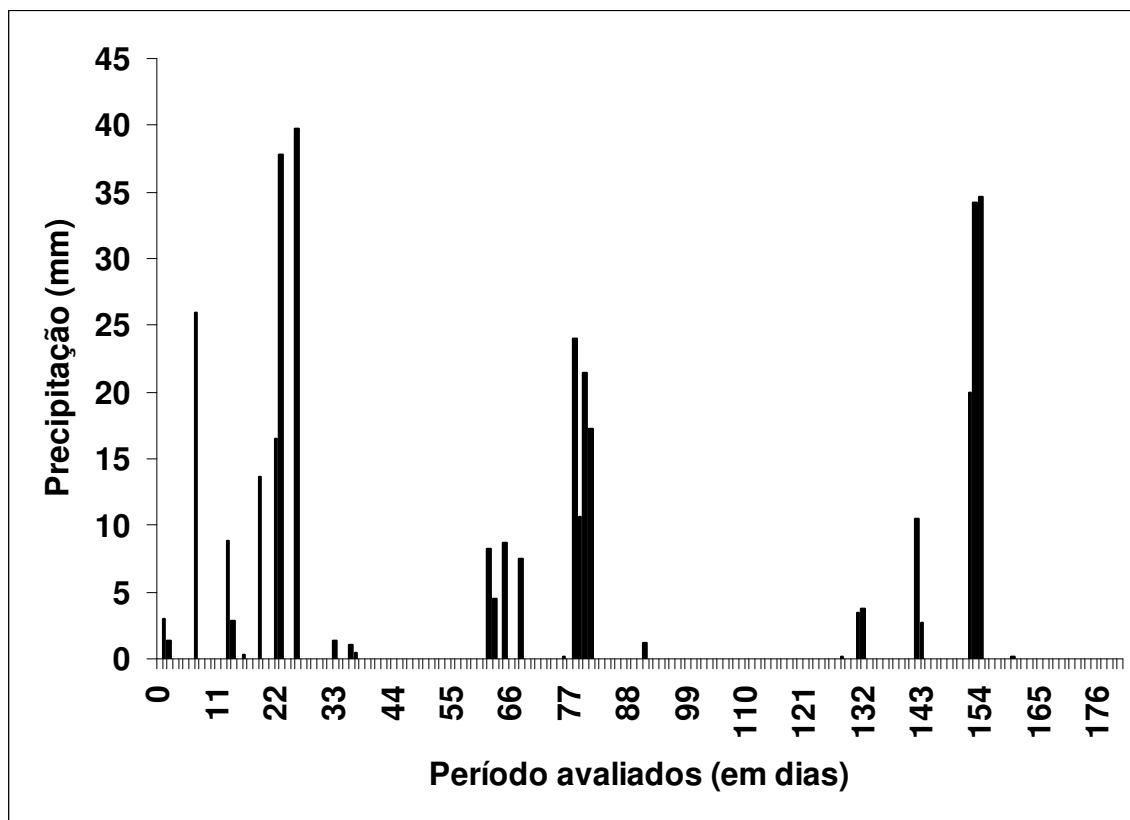


Figura 8. Precipitação diária registrada (em mm) no período do experimento.

6.2.1 *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2

Com base nos resultados da Figura 9 e Tabela 4 constata-se que a metodologia de produção de clamidósporos de *Fusarium* permite a sobrevivência do fungo em campo.

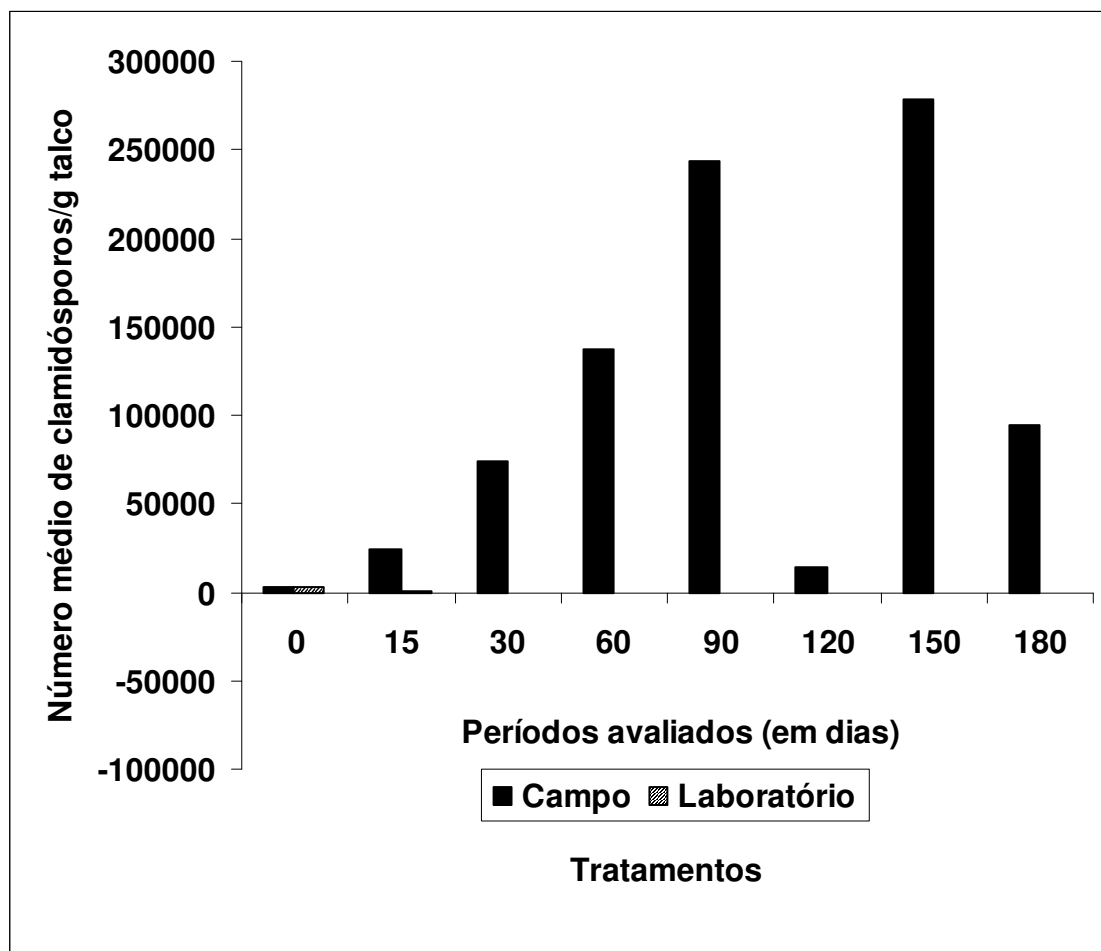


Figura 9. Sobrevivência de clamidósporos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2 enterrados no campo e dos mantidos em condições de laboratório durante seis meses.

Tabela 4. Mediana e valores mínimo e máximo da semi-amplitude interquartílica do número de colônias/g de talco de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2 que foi enterrado no campo e mantido em condições de laboratório por seis meses.

Tratamentos	Número de colônias/g de pó de talco	Resultado do teste estatístico
Campo	674.500 ¹ (27.000 ² ; 2.230.000) a ³	3,39 (P<0,001)
Laboratório	0 (0 ; 27.000) b	

¹Mediana;

²Semi-amplitude interquartílica com os valores mínimo e máximo;

³Médiana seguida de mesma letra na coluna não diferem entre si de acordo com comparações múltiplas de Siegel & Castellan Jr. (1988) a nível de 5% de probabilidade.

Com base nos resultados da Tabela 4 verifica-se que o tratamento do campo quanto à mediana do número de unidades formadoras de colônias/g de talco do fungo foi superior ao do laboratório. Analisando os dados da Tabela 4 constata-se que a metodologia desenvolvida para condições de laboratório é ineficaz e não indicada como padrão de sobrevivência (testemunha) das estruturas do fungo, pois as mesmas morreram após 15 dias de avaliação.

Na Figura 10 também pode-se observar a rapidez e a praticidade na avaliação da sobrevivência dos clamidósporos de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2, conforme metodologia descrita no item 5.3.1.1.



Figura 10. Unidades formadoras de colônias em meio de Komada provenientes de clamidósporos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2 em pó de talco.

Windels (1992) e Blok (1997) relataram a utilização do meio de cultura semi-seletivo de Komada para isolar *F. oxysporum*.

Toda a metodologia de produção e avaliação da sobrevivência deste patógeno foi desenvolvida por Blok (1997). No entanto, no presente trabalho, a suspensão do patógeno foi colocada de forma direta no talco sem a necessidade de centrifugação como feito por Blok (1997) para torná-la mais simples. Constatou-se no presente trabalho que a produção de clamidósporos no pó de talco é dependente dos conídios formados inicialmente no meio líquido de extrato de malte. Blok (1997), para veicular as estruturas em bolsas de náilon, efetuou uma pré-peneiragem, enquanto que na metodologia proposta o pó de talco+estruturas foi colocado diretamente na bolsa de náilon, após ser homogeneizado. Blok (1997) verificou a viabilidade das estruturas enterradas no solo, em bolsas de náilon, através da recuperação destas e retirada de uma amostra para efetuar diluição seriada em uma suspensão de ágar-água a 0,1% e plaqueamento de alíquotas em meio de Komada.

No presente trabalho, a verificação da sobrevivência de clamidósporos de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2 seguiu a mesma metodologia de Larkin et al. (1993), ou seja, após os autores infestarem artificialmente o solo de

containeres com clamidósporos de *F. oxysporum* f.sp. *niveum*, produzidos em solução de sais minerais, verificaram a sobrevivência das estruturas, efetuando diluição de amostra em solução salina seguido de plaqueamento em meio de Komada.

Observou-se, no presente trabalho, que o número médio de clamidósporos é maior, com o aumento do teor de umidade do solo (Figuras 8 e 9), o que explica a oscilação do número de sobreviventes do fungo. Segundo Lockwood (1977), na presença de umidade, as estruturas de resistência de *F. oxysporum* germinam e o micélio produz novos clamidósporos. Uma outra explicação, para tal oscilação no número médio de clamidósporos, está no fato do fungo sintetizar uma proteína nessas estruturas (Freeman et al., 1989), ativada por condições de estresse ambiental no solo, como altas temperaturas, garantindo essa sobrevivência variada do fungo.

Em condições de campo (Souza & Bueno, 2003) e em microcosmo (Bueno et al., 2004), estes autores utilizaram a metodologia desenvolvida no presente trabalho para testar o controle das estruturas de resistência de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2, combinando a técnica de solarização com a prévia incorporação de couve. Os dados do presente trabalho e os de Souza & Bueno (2003) e Bueno et al. (2004) atestam a eficiência da metodologia desenvolvida para o fungo.

6.2.2 *Macrophomina phaseolina*

Com base nos resultados da Figura 11 e Tabela 5 verifica-se que a metodologia desenvolvida para produção de microescleródios do fungo, preserva a sobrevivência das estruturas de *M. phaseoliana* tanto no campo como no laboratório.

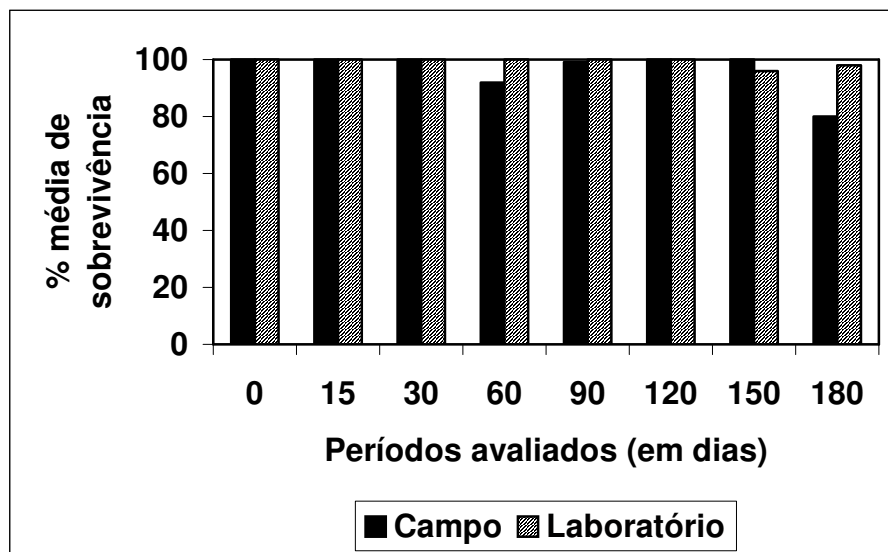


Figura 11. Sobrevivência de microescleródios de *Macrophomina phaseolina* enterrados no campo e dos mantidos em condições de laboratório durante seis meses.

Tabela 5. Soma das freqüências de sobrevivência (vivos e mortos) de microescleródios de *Macrophomina phaseolina* enterrados no campo e mantidos em condições de laboratório por seis meses.

Tratamentos	Sobrevivência	
	Vivos	Mortos
Campo	771 ¹ (96,38 ²) b ³	29 (3,62) a
Laboratório	794 (99,25) a	6 (0,75) b

¹Freqüência de sobrevivência: vivos e mortos;

²Porcentagem de sobreviventes: vivos e mortos. Média de dez repetições;

³Freqüência seguida de mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Goodman (1964).

De acordo com os dados da Tabela 5 constata-se que a soma das freqüências de sobrevivência dos microescleródios foi maior em condições de laboratório do que em campo. A diferença entre os tratamentos não implica em inviabilizar o uso da metodologia desenvolvida para o campo, pois essa variação deve-se, provavelmente, ao controle das estruturas por antagonistas e ao aumento na precipitação neste período, uma vez que este patógeno é natural de ambiente com deficiência hídrica.

Na Figura 12 pode-se também observar, como nas outras técnicas utilizadas para os demais patógenos, a facilidade, rapidez e segurança na avaliação da sobrevivência do fungo.



Figura 12. Colônias de *Macrophomina phaseolina* com formação de microescleródios em meio RB modificado a partir de estruturas do fungo em substrato areno-orgânico.

Para este patógeno, há relatos da utilização do meio RB para isolamento do patógeno do solo (Cloud et al., 1991). Entretanto, a metodologia desenvolvida para produção de microescleródios, a modificação do meio semi-seletivo e a avaliação da sobrevivência do fungo foram desenvolvidas no presente trabalho.

Viana (1996) relatou a produção de microescleródios de *M. phaseolina* no meio de cultura BDA gelatinoso seguido de trituração em liquidificador e peneiramento para obter microescleródios livres. Para avaliar a germinação dos microescleródios, o autor utilizou o método modificado de Hinz (1991) que consiste em utilizar um sistema denominado FAM (Frasco-Areia-Membrana de Celulose-Microescleródios). A observação da emergência do micélio dos microescleródios na membrana de celulose foi feita sob microscópio ótico.

Mihail (1992) relatou a produção de microescleródios de *M. phaseolina* sobre o meio de areia e farinha de milho. Este mesmo autor, citou a desinfestação superficial de sub-amostras de solo peneiradas com 0,525% de NaOCl por 10

minutos para eliminar microrganismos competidores que possam impedir o crescimento do fungo em meio de cultura. Essas amostras processadas foram transferidas sobre o meio semi-seletivo de M (39 g de BDA, 10 g de ágar, 160 mg de cloroneb, 250 mg de sulfato de estreptomicina e 1 L de água) e incubadas a 32-34°C por 3-4 dias. As colônias de *M. phaseolina* aparecem com um crescimento de micélio branco cotonoso e ao redor da colônia há a formação de microescleródios pretos.

A metodologia para produção de microescleródios de *M. phaseolina* em substrato areno-orgânico por 14 dias foi adaptada de Lefevre (1990) e não implica na separação das estruturas do substrato como utilizaram Viana (1996) e Mihail (1992), o que facilita o transporte destas estruturas para o campo, uma vez que utiliza-se do próprio substrato como veículo para os microescleródios. A avaliação da sobrevivência das estruturas pela metodologia proposta é prática, rápida e segura, uma vez que observa a emergência do micélio e a formação de microescleródios em torno das colônias no meio para mensurar e aferir a avaliação, assim como relatado por Mihail (1992). Já Viana (1996) observou apenas a emergência do micélio dos microescleródios na membrana de celulose do sistema FAM em microscópio ótico.

Lodha et al. (1997) verificaram a viabilidade de microescleródios do fungo, em solo infestado artificialmente, através da coleta de amostras e, após passá-las por um conjunto de peneiras e obter as estruturas individualizadas por ressuspensão em água destilada, os microescleródios foram plaqueados sobre o meio ágar-cloroneb-mercúrio-rosa bengal. Já Olaya et al. (1996) verificaram a viabilidade das estruturas do fungo, produzidas em palitos de madeira e enterradas no solo com diferentes potenciais de água, por meio da recuperação dos palitos e sua desinfestação em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 1 a 2 minutos e plaqueamento destes em meio de BDA acidificado.

No presente trabalho, propôs-se o plaqueamento das estruturas desinfestadas no meio RB modificado descrito no item 5.3.1.6, pois observou-se que a retirada do produto Tergitol da fórmula original propiciou o crescimento micelial e a formação de microescleródios de modo mais rápido, auxiliando na diagnose visual no meio de cultura.

Em condições de campo (Ambrósio et al., 2004) e em microcosmo (Bueno et al., 2004), estes autores utilizaram a metodologia desenvolvida no presente

trabalho para *M. phaseolina* para testar o controle das estruturas do patógeno, combinando a técnica de solarização com a prévia incorporação de brócolos. Os dados do presente trabalho e os de Ambrósio et al. (2004) e de Bueno et al. (2004) atestam a eficiência da metodologia desenvolvida para o fungo.

6.2.3 *Rhizoctonia solani* GA4 HGI

De acordo com os dados da Figura 13 e Tabela 6 observa-se que as estruturas do fungo, produzidas através da metodologia adotada por Lefevre (1990), sobrevivem no solo na forma de escleródios, em condições de campo, apesar de serem produzidas artificialmente.

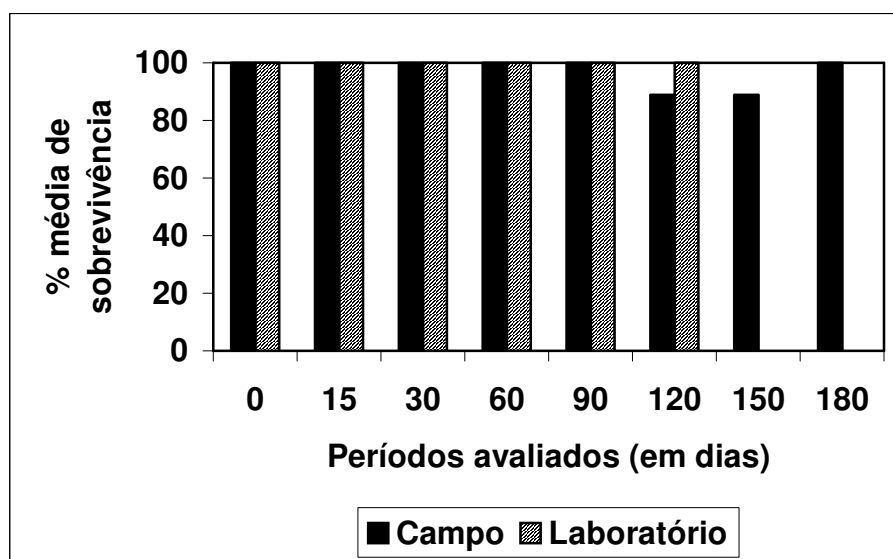


Figura 13. Sobrevivência de escleródios de *Rhizoctonia solani* enterrados no campo e dos mantidos em condições de laboratório durante seis meses.

Tabela 6. Soma das freqüências de sobrevivência (vivos e mortos) de escleródios de *Rhizoctonia solani* enterrados no campo e mantidos em condições de laboratórios por seis meses.

Tratamentos	Sobrevivência	
	Vivos	Mortos
Campo	778 ¹ (97,25 ²) a ³	22 (2,75) b
Laboratório	600 (75,00) b	200 (25,00) a

¹Freqüência de sobrevivência: vivos e mortos;

²Porcentagem de sobreviventes: vivos e mortos. Média de dez repetições;

³Freqüência seguida de mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Goodman (1964).

Com base nos dados da Tabela 6 constata-se que a soma das freqüências de sobrevivência de microescleródios do fungo foi maior no campo do que no laboratório. As estruturas mantidas em condições de laboratório morreram após 4 meses, o que inviabiliza a utilização desta metodologia nesta condição. Essa observação permite inferir que para experimentos de campo, visando controle das estruturas do fungo deve-se ter como padrão de sobrevivência dos escleródios (testemunha), a colocação dos mesmos em condições de solo normal.

Na Figura 14, nota-se a praticidade, rapidez e segurança na avaliação da sobrevivência das estruturas do fungo pela metodologia desenvolvida no presente trabalho.



Figura 14. Colônias de *Rhizoctonia solani* em meio de KHMP originadas a partir de escleródios do fungo em substrato areno-orgânico.

A metodologia de produção das estruturas de *R.solani* e o meio KHMP já são citados na literatura (Lefevre, 1990; Ko & Hora, 1971; Carling & Sumner 1992). Entretanto, a metodologia desenvolvida para a avaliação da sobrevivência do fungo foi desenvolvida no presente trabalho.

Blok (1997) produziu inóculo de *R. solani* Kühn GA 3 sobre perlita esterilizada embebida em solução de 1,5% de extrato de malte e 0,1% de peptona. Para o teste de sobrevivência do fungo, o autor efetuou a contagem do crescimento de hifas por perlita seguido do uso de uma fórmula para determinar o índice de germinação do patógeno.

Carling & Sumner (1992) citaram a desinfestação superficial de tecidos de plantas infectados por *Rhizoctonia* spp. com etanol 70° por 30 segundos, 1-2 minutos em 0,5% de NaOCl seguido de lavagem em água destilada esterilizada para eliminar contaminantes.

Na metodologia desenvolvida no presente trabalho, o substrato areno-orgânico + escleródios passou por desinfestação superficial seguindo as seguintes etapas: rápida imersão em álcool 70°, 5 segundos em solução de hipoclorito de sódio a 1% e lavagens em água destilada esterilizada, diferindo da seqüência de assepsia Carling & Sumner (1992) em tecido de planta. O substrato areno-orgânico+escleródios, após desinfestação superficial, foi transferido para o meio de KHMP (Ko & Hora, 1971) assim como citado por Carling & Sumner (1992) que também atestaram a utilização deste meio de cultura semi-seletivo para *Rhizoctonia* spp. A avaliação do crescimento micelial foi feita em microscópio estereoscópico, já que este fungo é identificado através da morfologia da hifa. Para facilitar a diagnose da sobrevivência das estruturas do fungo no meio coloca-se o corante lactofenol sobre as porções do substrato corando as hifas, auxiliando a avaliação.

Segundo Márcia Michelle de Ambrósio Queiroz (comunicação pessoal), que está utilizando a presente metodologia desenvolvida para este fungo em sua tese de doutorado, relata que a mesma está sendo eficiente.

6.2.4 *Sclerotium rolfsii*

Com base nos resultados dos dados da Figura 15 e Tabela 7 verifica-se que a metodologia desenvolvida para produção de estruturas de resistência do fungo, possibilita a sobrevivência das mesmas tanto em condições de campo quanto de laboratório, de maneira individualizada.

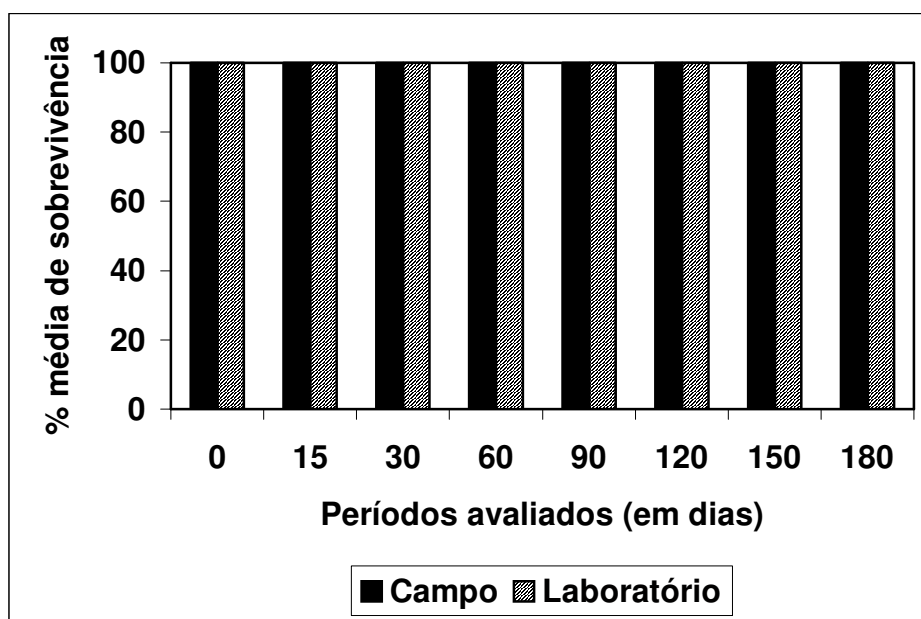


Figura 15. Sobrevivência de escleródios de *Sclerotium rolfsii* livres enterrados no campo e dos mantidos em condições de laboratório durante seis meses.

Tabela 7. Soma das freqüências de sobrevivência (vivos e mortos) de escleródios de *Sclerotium rolfsii* enterrados no campo e mantidos em condições de laboratório por seis meses.

Tratamentos	Sobrevivência	
	Vivos	Mortos
Campo	800 ¹ (100,0 ²) a ³	0 (0,00) a
Laboratório	800 (100,0) a	0 (0,00) a

¹Freqüência de sobrevivência: vivos e mortos;

²Porcentagem de sobreviventes: vivos e mortos. Média de dez repetições;

³Freqüência seguida de mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Goodman (1964).

De acordo com os dados da Tabela 7 constata-se que ambos os tratamentos não diferiram entre si quanto à soma das frequências de sobrevivência de escleródios do fungo, o que assegura a utilização da metodologia desenvolvida para as duas condições dos tratamentos. Essa observação permite inferir que para experimentos de campo, visando controle das estruturas do fungo pode-se optar pelo padrão de sobrevivência dos escleródios (testemunha) pela colocação dos mesmos em ambas situações, dependendo do objetivo do ensaio.

Como pode ser visto na Figura 16, o método facilita a avaliação da sobrevivência dos escleródios de maneira rápida, prática e segura.



Figura 16. Colônias de *Sclerotium rolf sii* em meio de Batata Dextrose Ágar + oxitetraciclina originadas a partir de escleródios do fungo.

Lefevre (1990) multiplicou *S. rolf sii* em substrato areno-orgânico e avaliou a viabilidade do fungo pelo plaqueamento de porções do substrato sobre o meio de BDA+oxitetraciclina, observando a emergência de micélio das porções do substrato.

Mihail & Alcorn (1984) citaram a produção de escleródios de *S. rolf sii* em BDA, veiculando as estruturas em bolsas de náilon, desinfestando-as por 1 a 2 minutos em 0,525% de NaOCl e plaqueando os escleródios em meio BDA + sulfato de estreptomicina.

Resende & Zambolim (1986), desenvolveram uma técnica para quantificar população de escleródios de *S. cepivorum* do solo. Os autores citaram ainda que os escleródios obtidos pela técnica foram imersos por três minutos em solução contendo sete concentrações crescentes de cloro ativo, desde 0,12 até 2,50%, na desinfestação superficial e verificaram que a concentração de 1,5% evitou o aparecimento de contaminantes e não afetou a viabilidade dos mesmos.

Punja & Rahe (1992) relataram a vasta utilização do método de peneiramento sob jato de água para isolamento de escleródios de *S. cepivorum* do solo. No entanto, esta técnica pode enfrentar problemas com solo texturizado e com muita matéria orgânica, o que inviabiliza a detecção dos escleródios.

Na metodologia desenvolvida no presente trabalho, o meio de produção de escleródios, BDA+0,05mg/mL de oxitetraciclina, foi utilizado também para a avaliação da sobrevivência do fungo, diferindo de Lefevre (1990) e Resende & Zambolim (1986). O tempo de exposição dos escleródios na solução de hipoclorito de sódio a 1,5% utilizado neste trabalho diferiu da metodologia de Resende & Zambolim (1986) para *S. cepivorum*. A metodologia desenvolvida para *S. rolfsii* é de fácil manuseio e segura para qualquer ambiente, diferindo de Punja & Rahe (1992) que citaram a inviabilização da técnica de peneiramento sob jato de água para isolar escleródios de *S. cepivorum* em solos texturizados e com alto teor de matéria orgânica.

Para isolados que produzem pequenos escleródios, dificultando o manuseio dos mesmos, pode-se tentar a produção das estruturas em substrato areno-orgânico, assim como relatado por Lefevre (1990). No entanto, precisa-se verificar a eficiência da avaliação da sobrevivência do fungo proposta no presente trabalho com a metodologia de Lefevre (1990).

Em condições de campo (Souza & Bueno, 2003) e em microcosmo (Bueno et al., 2004), estes autores utilizaram a metodologia desenvolvida no presente trabalho para *S. rolfsii*, visando testar o controle do patógeno pela solarização associada a prévia incorporação de couve em campo. Com base nos resultados do presente trabalho e nos de Souza & Bueno (2004) e Bueno et al. (2004), verifica-se a eficiência da metodologia desenvolvida para *S. rolfsii*.

6.2.5 *Sclerotinia sclerotiorum*

Com base nos resultados da Figura 17 e Tabela 8 verifica-se que os escleródios individualizados de *S. sclerotiorum* podem ser enterrados no campo, pois permanecem viáveis, assegurando a eficiência da metodologia de Ferraz & Café Filho (1998) para a produção de estruturas do fungo.

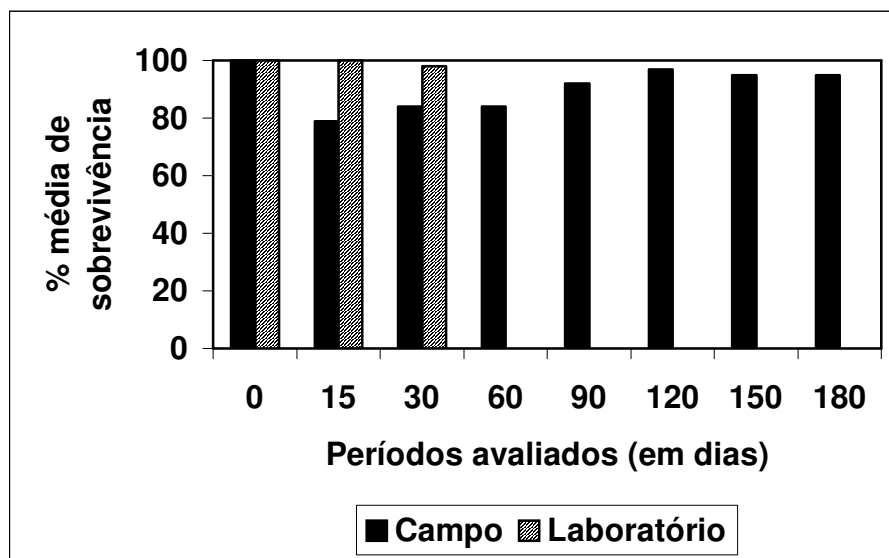


Figura 17. Sobrevivência de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* livres enterrados no campo e dos mantidos em condições de laboratório durante seis meses.

Tabela 8. Soma das freqüências de sobrevivência (vivos e mortos) de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* enterrados no campo e mantidos em condições de laboratório por seis meses.

Tratamentos	Sobrevivência	
	Vivos	Mortos
Campo	726 ¹ (90,75 ²) a ³	74 (9,25) b
Laboratório	298 (37,25) b	502 (62,75) a

¹Freqüência de sobrevivência: vivos e mortos;

²Porcentagem de sobreviventes: vivos e mortos. Média de dez repetições;

³Freqüência seguida de mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Goodman (1964).

De acordo com os dados da Tabela 8 constata-se que a soma das freqüências de sobrevivência de escleródios do fungo foi maior no campo do que no laboratório. As estruturas mantidas em condições de laboratório morreram após um mês, o

que inviabiliza a utilização desta metodologia nesta condição. Essa observação permite inferir que para experimentos de campo, visando controle das estruturas do fungo deve-se ter como padrão de sobrevivência dos escleródios (testemunha), a colocação dos mesmos em condições de solo de campo, em vez de mantê-los em condições de laboratório.

Como pode ser visto na Figura 18, o método permite a avaliação da sobrevivência do fungo, pois a estrutura quando viável muda a cor do meio de azul para amarelo, facilitando a diagnose visual, conforme relatado por Nasser et al. (1995).



Figura 18. Colônias (cor amarela) de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio de Neon originadas a partir de escleródios do fungo.

Ferraz (2001) relatou que, para verificar a viabilidade dos escleródios, estes foram lavados em água corrente por 5 minutos e submetidos à seguinte assepsia: 3 minutos em uma solução de hipoclorito de sódio a 1% e 3 minutos em álcool 50°. No presente trabalho, os escleródios foram submetidos à assepsia passando pelas seguintes etapas: 1 minuto em álcool 50° e 3 minutos em uma solução de hipoclorito de sódio a 1%, assim como citado por Nasser et al. (1995). Em ambos os trabalhos, os escleródios desinfestados foram colocados sobre o meio semi-seletivo de Neon e incubados no escuro a 18°C (Ferraz & Café Filho, 1998).

O desenvolvimento da presente metodologia seguiu parte dos trabalhos de Ferraz & Café Filho (1998), Ferraz (2001) e Nasser et al. (1995). A eficiência da mesma para condições de campo foi atestada pelos dados das Figuras 17 e 18 e pela Tabela 8.

6.2.6 *Verticillium dahliae*

Com base nos dados da Figura 19 e Tabela 9 observa-se que os microescleródios do fungo produzidos com a metodologia desenvolvida sobrevivem tanto no campo como no laboratório durante o período estudado.

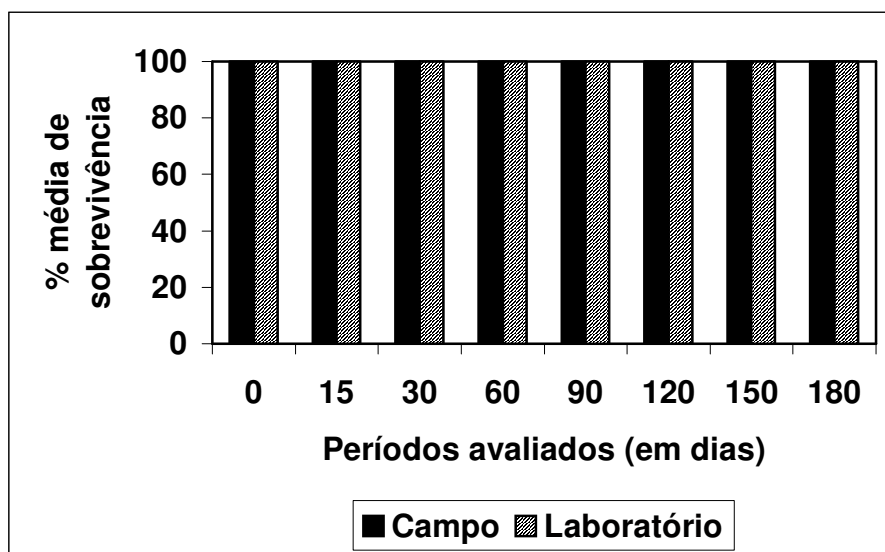


Figura 19. Sobrevivência de microescleródios de *Verticillium dahliae* enterrados no campo e dos mantidos em condições de laboratório durante seis meses.

Tabela 9. Soma das freqüências de sobrevivência (vivos e mortos) de microescleródios de *Verticillium dahliae* enterrados no campo e mantidos em condições de laboratório por seis meses.

Tratamentos	Sobrevivência	
	Vivos	Mortos
Campo	800 ¹ (100,0 ²) a ³	0 (0,00) a
Laboratório	800 (100,0) a	0 (0,00) a

¹Freqüência de sobrevivência: vivos e mortos;

²Porcentagem de sobreviventes: vivos e mortos. Média de dez repetições;

³Freqüência seguida de mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Goodman (1964).

A avaliação dos dados da Tabela 9 para o fungo *V. dahliae*, conduz às mesmas conclusões dos dados da Tabela 7 para o fungo *S. rolfsii*.

Como pode ser visto pela Figura 20, o método permite avaliar a sobrevivência dos microescleródios do patógeno com facilidade, rapidez e segurança.

Não há na literatura nenhuma metodologia como a desenvolvida para este fungo, apenas a citação do meio semi-seletivo para isolar o patógeno do solo (Ausher et al., 1975).

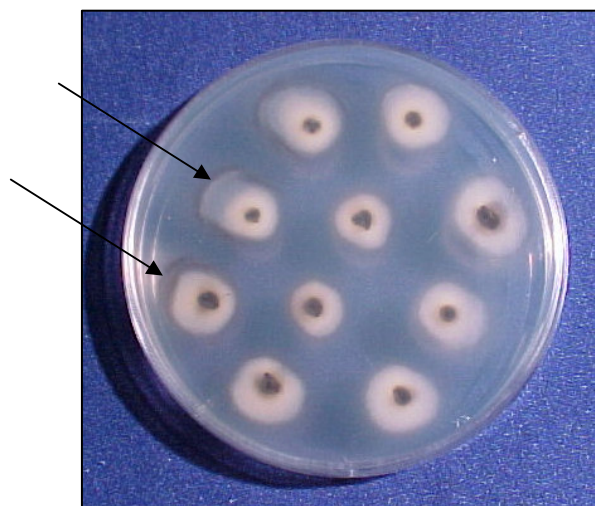


Figura 20. Colônias de *Verticillium dahliae* com formação de microescleródios nas bordas em meio de Ausher originadas a partir de estruturas do fungo em substrato areno-orgânico.

Com base nos resultados de testes preliminares constatou-se que as estruturas de *V. dahliae* não suportam desinfestação superficial com solução de hipoclorito de sódio mesmo em baixas concentrações e em tempos curtos. No entanto, de acordo com a ilustração da Figura 20, fragmentos do substrato contendo microescleródios podem ser diretamente plaqueados, após umedecimento em água destilada esterilizada, para o meio semi-seletivo de Ausher.

Francel et al. (1988) para verificarem o potencial de inóculo do patógeno, produzido em um meio mínimo, coletaram amostra do solo infestado com as estruturas do fungo e através de diluição seriada, plaquearam alíquotas em meio de álcool + estreptomicina. Já Blok (1997) verificou a sobrevivência de microescleródios do patógeno pelo método de peneiramento do inóculo (estruturas+solo) e ressuspensão das estruturas em ágar-água a 0,08% com plaqueamento dos microescleródios sobre extrato de solo com ágar.

Observou-se no presente trabalho, a necessidade de deixar as placas de Petri com as estruturas por 30 dias em estufa tipo BOD para haver a formação de escleródios em torno das colônias, certificando, assim, a diagnose visual do patógeno, como observado na Figura 20.

Bourbos & Skoudridakis (1996) relataram a metodologia para estimar a quantidade de *V. dahliae* no solo pelo método de diluição seriada de amostra de solo em água destilada esterilizada seguido de plaqueamento de alíquotas no meio de Mirulatova & Kirava (1996) citado por Bourbos & Skoudridakis (1996).

Bueno et al. (2000), utilizaram uma hospedeira do patógeno (Berinjela – *Solanum melongena* L.) como indicadora para estimar a quantidade do patógeno no solo, após tratamento com solarização, pela incidência da doença nas plantas.

Termoshuizen et al. (1998) compararam diferentes métodos para estimar *V. dahliae* no solo, utilizando 13 grupos de pesquisadores de sete países do mundo, concluindo que os métodos não são capazes de reproduzir resultados confiáveis a partir de amostras conhecidas.

Melouk (1992) citou a desinfestação de estruturas do patógeno obtidas através do método de peneiramento úmido de amostras de solo e posteriormente transferidas em meio semi-seletivo para isolamento do patógeno.

Pela metodologia desenvolvida no presente trabalho não há necessidade de utilizar plantas hospedeiras (Bueno et al., 2000) e também determinar a população do patógeno no solo (Melouk, 1992; Bourbos & Skoudridakis, 1996), o que contraria a afirmação de Termorshuizen et al. (1998), de que as metodologias de determinação da população do patógeno no solo não são confiáveis. As estruturas do fungo não passam por uma desinfestação superficial segundo a metodologia do presente trabalho, contradizendo uma citação de Melouk (1992).

6.3 Sobrevivência e vigor das estruturas nas diferentes temperaturas

6.3.1 *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2

De acordo com os dados da Figura 21 e Tabela 10 constata-se que a melhor condição para se manter a viabilidade de clamidósporos de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2, em pó de talco, dá-se em temperatura de geladeira e de freezer. Segundo Freeman et al. (1989), este fungo sintetiza uma proteína nas suas estruturas de resistência quando ocorrem situações de estresse ambiental, como, por exemplo, em altas temperaturas no solo. Dessa forma, o fungo torna-se mais resistente e garante a sua sobrevivência. No presente trabalho, constata-se uma oscilação no número médio de clamidósporos do fungo nas condições de temperatura de geladeira e de freezer, durante o período avaliado. Uma hipótese aventada para explicar essa oscilação na sobrevivência do fungo, pode ser a ativação da mesma proteína observada por Freeman et al. (1989) nas estruturas de resistência, mas em condições de baixa temperatura, como a de geladeira e de freezer do presente trabalho.

Windels (1992) citou que a liofilização é o melhor método de preservação de diferentes espécies de *Fusarium* por longos períodos de tempo. Segundo Dhingra & Sinclair (1995), neste método, o patógeno ou suas estruturas perdem água e são armazenados na ausência de oxigênio e vapor de água.

Dhingra & Sinclair (1995) relataram a preservação do fungo por longos períodos de tempo nos métodos de Castellani e em solo e constataram também, a preservação por cinco anos de várias espécies de *Fusarium* no método de sílica-gel a temperatura de 5°C, o que corrobora com os dados do presente trabalho para temperatura de geladeira (5°C).

Segundo ainda Dhingra & Sinclair (1995), o método de óleo mineral não é muito indicado para *Fusarium*. Windels (1992) não recomenda para este fungo a preservação de culturas em solo esterilizado ou em BDA.

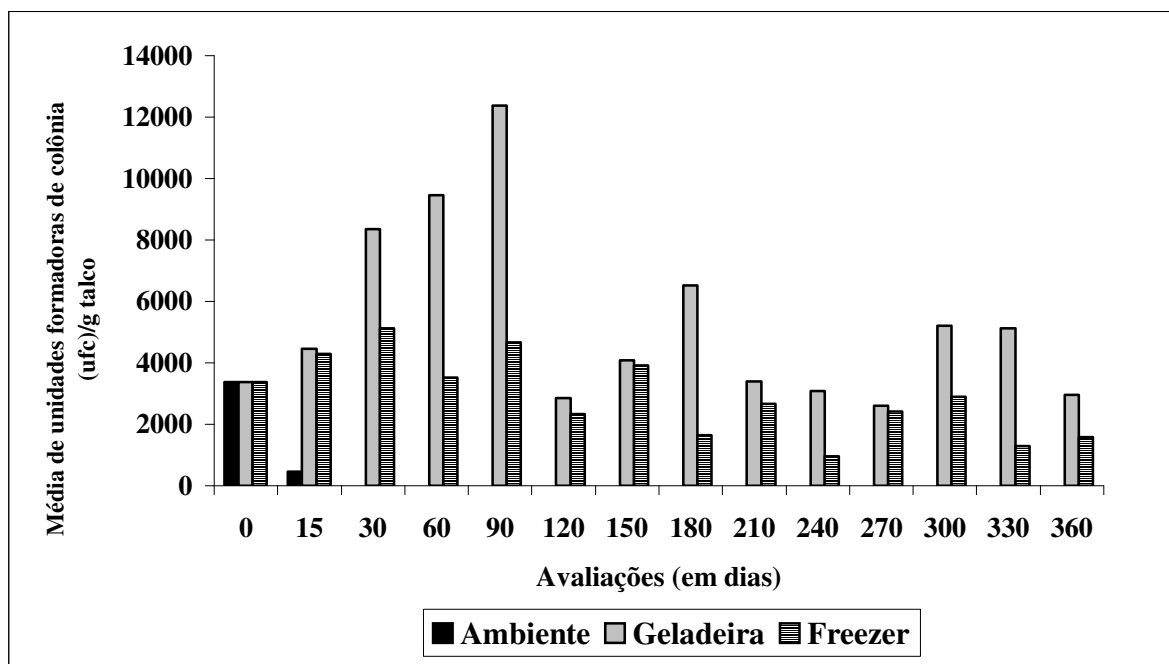


Figura 21. Sobrevivência de clamidósporos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2 submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de avaliação.

Tabela 10. Mediana e valores mínimo e máximo da semi-amplitude interquartílica do número de colônias/g de talco de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2 crescidas a partir de clamidósporos que foram submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de armazenagem.

Tratamentos	Número de colônias/g de pó de talco	Resultado do teste estatístico
Ambiente	0 ¹ (0 ² ; 27.000) b ³	26,93 (P<0,0001)
Geladeira	34.150 (20.000 ; 98.000) a	
Freezer	22.250 (7.600 ; 41.000) a	

¹Mediana;

²Semi-amplitude interquartílica com os valores mínimo e máximo;

³Mediana seguida de mesma letra na coluna não diferem entre si de acordo com comparações múltiplas de Siegel & Castellan Jr. (1988) a nível de 5% de probabilidade.

6.3.2 *Macrophomina phaseolina*

Com base nos resultados das Figuras 22 e 23 e Tabelas 11 e 12 verifica-se que até um ano de experimento, a melhor temperatura para manter a viabilidade dos microescleródios de *M. phaseolina*, produzidos e armazenados na forma de substrato areno-orgânico, foi a de geladeira, pois os mesmos mantiveram 100% de sobrevivência durante um ano e com o maior vigor (3).

Mihail (1992) citou que microescleródios de *M. phaseolina* produzidos sobre palito de madeira e mantidos em temperatura ambiente podem ser preservados neste método por 5 anos ou mais. Ainda segundo Mihail (1992), pode-se armazenar isolados do patógeno no método de congelamento (-70°C).

No presente trabalho, os dados da temperatura de freezer (-20°C) mostram que o isolado de *Macrophomina phaseolina* morreu após dois meses de avaliação, inviabilizando a preservação do fungo nesta condição.

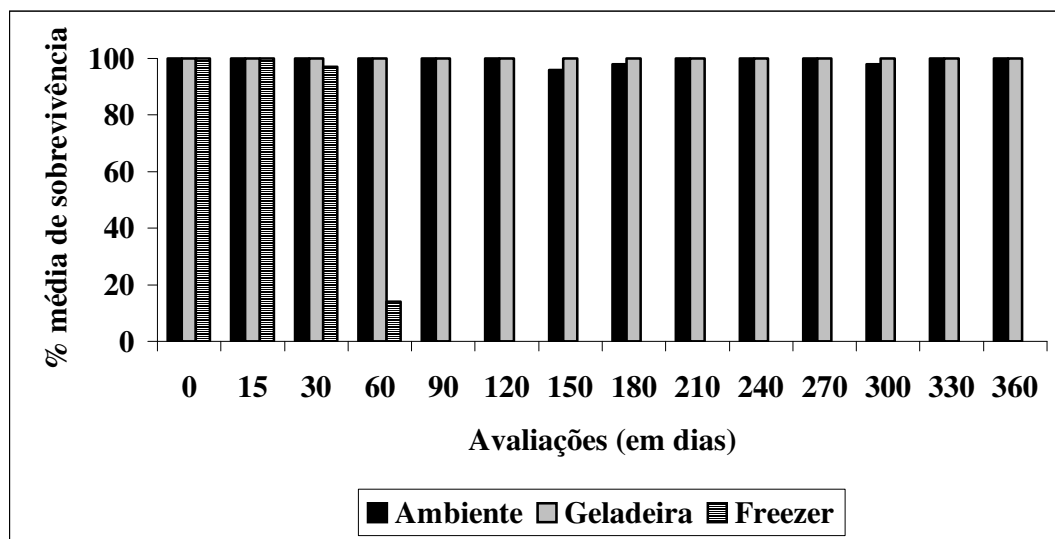


Figura 22. Sobrevivência de microescleródios de *Macrophomina phaseolina* submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de avaliação.

Tabela 11. Soma das freqüências de sobrevivência (vivos e mortos) de microescleródios de *Macrophomina phaseolina* armazenados por um ano em condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer.

Tratamentos	Sobrevivência	
	Vivos	Mortos
Ambiente	1392 ¹ (99,43 ²) b ³	8 (0,57) b
Geladeira	1400 (100,00) a	0 (0,00) a
Freezer	311 (22,21) c	1089 (77,79) c

¹Freqüência de sobrevivência: vivos e mortos;

²Porcentagem de sobreviventes: vivos e mortos. Média de dez repetições;

³Freqüência seguida de mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Goodman (1964).

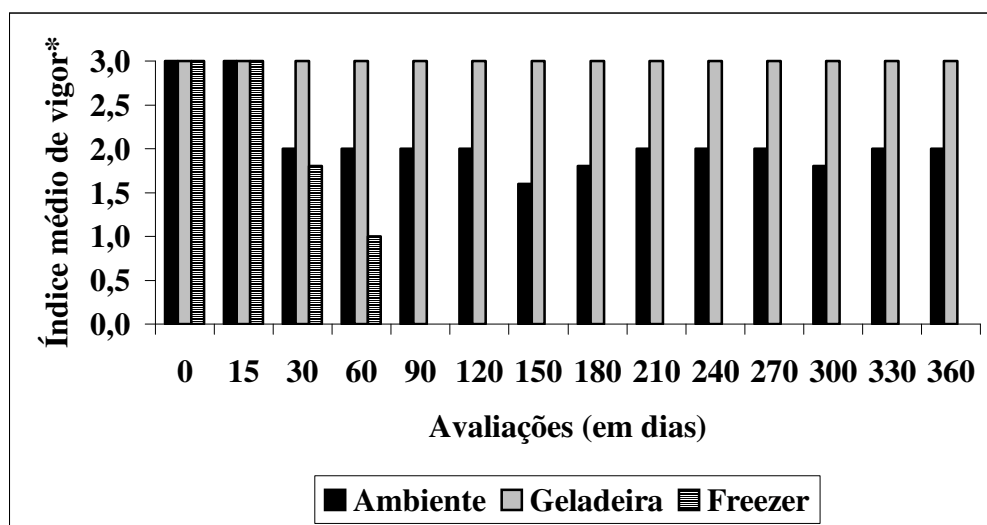


Figura 23. Vigor das colônias de *Macrophomina phaseolina* crescidas a partir de microescleródios submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de avaliação.

*Escala de notas (vigor): 0 – ausência de germinação; 1 – germinação de algumas estruturas; 2 – germinação de todas as estruturas com micélio pouco vigoroso; 3 – germinação de todas as estruturas com micélio vigoroso, mantendo as características de esporulação e de aparecimento de estruturas de resistência.

Tabela 12. Mediana e valores mínimo e máximo da semi-amplitude interquartílica da soma das notas do índice de vigor das colônias de *Macrophomina phaseolina* crescidas a partir de microescleródios submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer.

Tratamentos			Resultado do teste estatístico
Ambiente	Geladeira	Freezer	
20 ¹ (16-30 ²) b ³	30 (30-30) a	0 (0-30) c	24,74 (P<0,01)

¹Mediana;

²Semi-amplitude interquartílica com os valores mínimo e máximo;

³Médiana seguida de mesma letra na linha não diferem entre si estatisticamente a nível de 5% de probabilidade de acordo com as comparações múltiplas de Norman & Streiner (1994).

6.3.3 *Rhizoctonia solani* GA4 HGI

De acordo com os dados das Figuras 24 e 25 observa-se que para *R. solani*, armazenar escleródios produzidos em substrato areno-orgânico não foi promissor, pois os mesmos não suportaram preservação em nenhuma das três temperaturas testadas, após cinco meses de avaliação. Quanto à sobrevivência dos escleródios (Tabela 13) e o vigor das colônias (Tabela 14), não se constatou diferença significativa entre os tratamentos (ambientes) nos dois parâmetros avaliados.

Carling & Sumner (1992) relataram que isolados de *Rhizoctonia* podem ser mantidos no laboratório em temperatura ambiente (20-30°C) por 6-12 meses em meio PDYA (Batata dextrose levedura ágar), em placa de petri com o meio BDA, em tecidos de plantas infectados ou em solo contendo 4% de farelo de trigo. No presente trabalho, os escleródios de *R. solani* GA 4 HGI mantidos nos três ambientes morreram após cinco meses de avaliação, o que contradiz a afirmação de Carling & Sumner (1992) quanto à preservação em temperatura ambiente. Culturas de *Rhizoctonia* não podem ser armazenadas segundo Carling & Sumner (1992) em temperatura de refrigerador porque diminui a viabilidade do patógeno, o que corrobora com os dados obtidos no presente trabalho, pois os escleródios mantidos em temperatura de geladeira morreram após cinco

meses de avaliação. Em temperatura de freezer (-20°C), o fungo morreu após cinco meses de avaliação no presente trabalho, inviabilizando a preservação nesta condição.

Carling & Sumner (1992) citam que muitos isolados de *Rhizoctonia* podem ser mantidos por 10 anos ou mais em grãos.

Dhingra & Sinclair (1995) relataram a preservação de culturas do fungo por alguns anos no método de Castellani. Esses autores constataram também a preservação do fungo por longos períodos de tempo no método de armazenagem em solo.

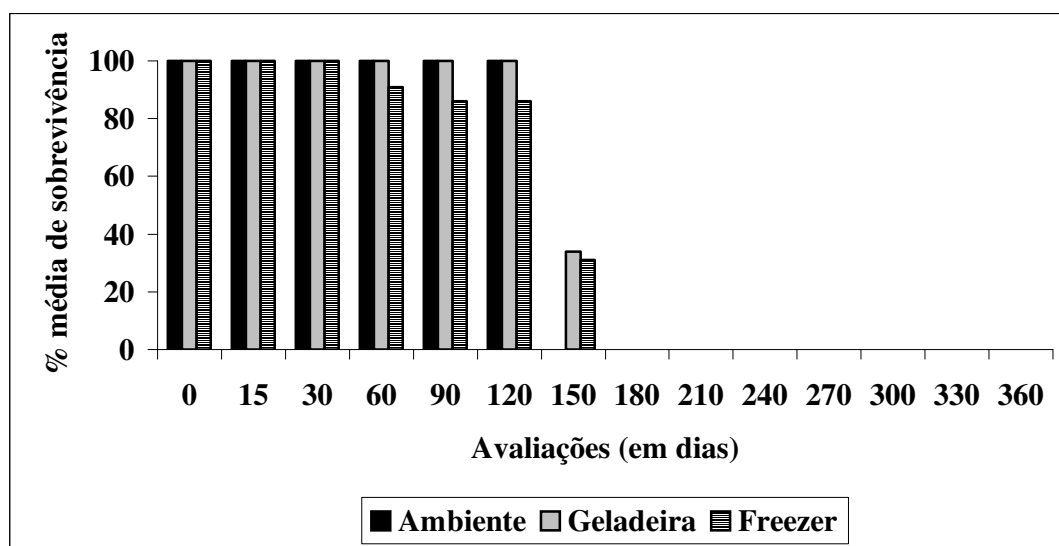


Figura 24. Sobrevivência de escleródios de *Rhizoctonia solani* submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de avaliação.

Tabela 13. Soma das frequências de sobrevivência (vivos e mortos) de escleródios de *Rhizoctonia solani* armazenados por um ano em condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer.

Tratamentos	Sobrevivência	
	Vivos	Mortos
Ambiente	600 ¹ (42,86 ²) a ³	800 (57,14) a
Geladeira	634 (45,29) a	766 (54,71) a
Freezer	594 (42,43) a	806 (57,57) a

¹Frequência de sobrevivência: vivos e mortos;

²Porcentagem de sobreviventes: vivos e mortos. Média de dez repetições;

³Frequência seguida de mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Goodman (1964).

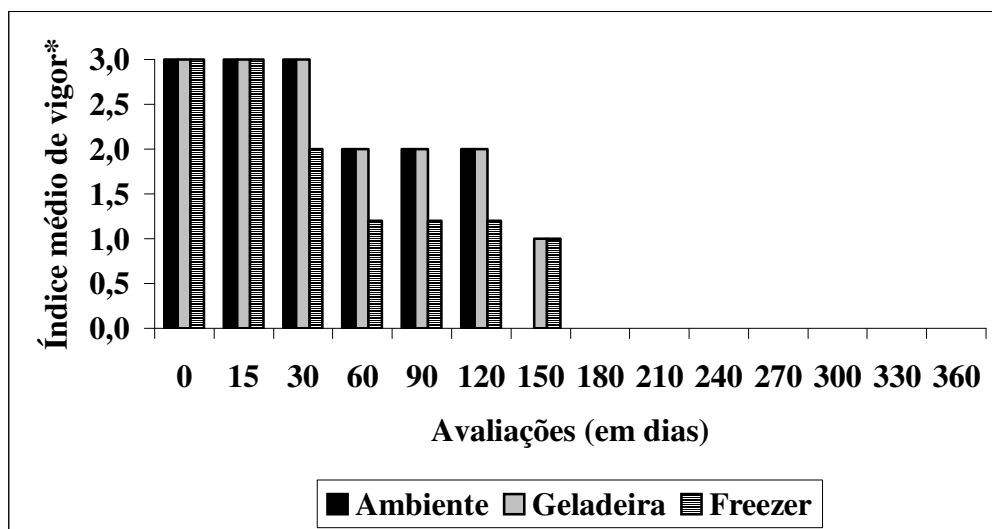


Figura 25. Vigor das colônias de *Rhizoctonia solani* crescidas a partir de escleródios submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de avaliação.

*Escala de notas (vigor): 0 – ausência de germinação; 1 – germinação de algumas estruturas; 2 – germinação de todas as estruturas com micélio pouco vigoroso; 3 – germinação de todas as estruturas com micélio vigoroso, mantendo as características de esporulação e de aparecimento de estruturas de resistência.

Tabela 14. Mediana e valores mínimo e máximo da semi-amplitude interquartílica da soma das notas do índice de vigor das colônias de *Rhizoctonia solani* crescidas a partir de escleródios submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de armazenagem.

Tratamentos			Resultado do teste estatístico
Ambiente	Geladeira	Freezer	
0 ¹ (0-30 ²) a ³	5 (0-30) a	5 (0-30) a	0,12 (P>0,05)

¹Mediana;

²Semi-amplitude interquartílica com os valores mínimo e máximo;

³Médiana seguida de mesma letra na linha não diferem entre si estatisticamente a nível de 5% de probabilidade de acordo com as comparações múltiplas de Normal & Streiner (1994).

6.3.4 *Sclerotium rolfii*

De acordo com os resultados das Figuras 26 e 27 e Tabelas 15 e 16 verifica-se que para *S. rolfii*, armazenar escleródios na forma individualizada, nas três temperaturas testadas, não foi ideal. No entanto, os escleródios armazenados suportaram por um ano em temperatura natural de laboratório (ambiente), mas com diminuição de 25,6% da sobrevivência e índice médio de vigor 1. Punja & Rahe (1992) citaram a viabilidade por um ano dos escleródios de *S. rolfii* armazenados em temperatura ambiente, o que corrobora com os dados obtidos do presente trabalho.

Segundo Punja & Rahe (1992), a viabilidade do fungo pode ser de cinco anos ou mais quando preservado em óleo mineral.

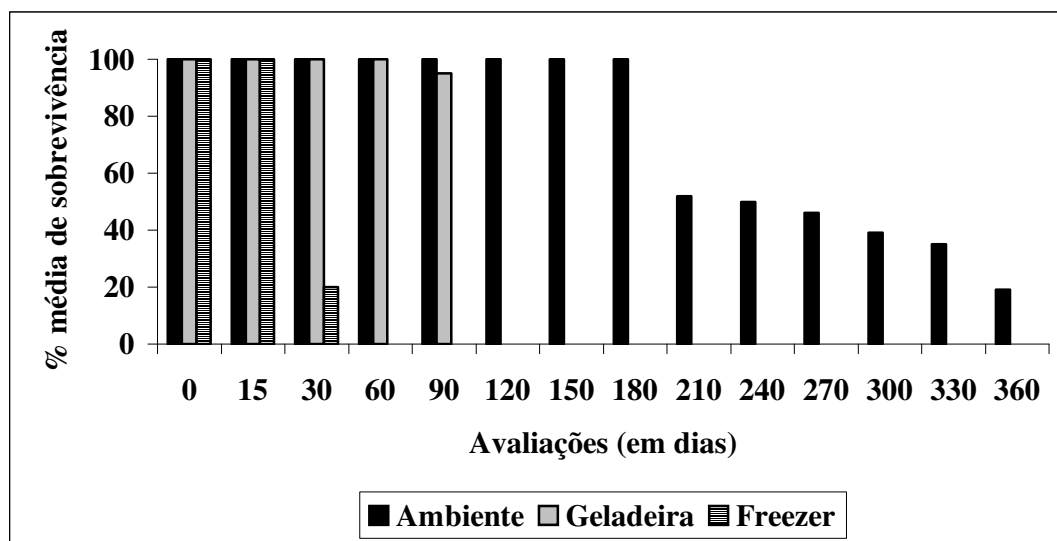


Figura 26. Sobrevivência de escleródios de *Sclerotium rolfii* submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de avaliação.

Tabela 15. Soma das freqüências de sobrevivência (vivos e mortos) de escleródios de *Sclerotium rolfsii* armazenados por um ano em condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer.

Tratamentos	Sobrevivência	
	Vivos	Mortos
Ambiente	1041 ¹ (74,36 ²) a ³	359 (25,64) c
Geladeira	495 (35,36) b	905 (64,64) b
Freezer	220 (15,71) c	1180 (84,29) a

¹Freqüência de sobrevivência: vivos e mortos;

²Porcentagem de sobreviventes: vivos e mortos. Média de dez repetições;

³Freqüência seguida de mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Goodman (1964).

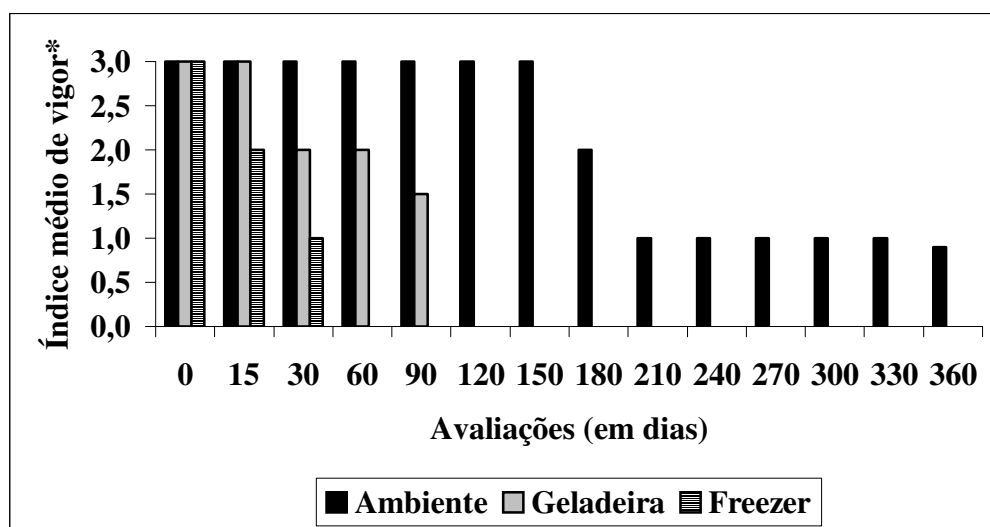


Figura 27. Vigor das colônias de *Sclerotium rolfsii* crescidas a partir de escleródios submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de avaliação.

*Escala de notas (vigor): 0 – ausência de germinação; 1 – germinação de algumas estruturas; 2 – germinação de todas as estruturas com micélio pouco vigoroso; 3 – germinação de todas as estruturas com micélio vigoroso, mantendo as características de esporulação e de aparecimento de estruturas de resistência.

Tabela 16. Mediana e valores mínimo e máximo da semi-amplitude interquartílica da soma das notas do índice de vigor das colônias de *Sclerotium rolfsii* crescidas a partir de escleródios submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de armazenagem.

Tratamentos			Resultado do teste estatístico
Ambiente	Geladeira	Freezer	
25 ¹ (9-30 ²) a ³	0 (0-30) b	0 (0-30) b	13,78 (P<0,01)

¹Mediana;

²Semi-amplitude interquartílica com os valores mínimo e máximo.;

³Médiana seguida de mesma letra na linha não diferem entre si estatisticamente a nível de 5% de probabilidade de acordo com as comparações múltiplas de Norman & Streiner (1994).

6.3.5 *Sclerotinia sclerotiorum*

De acordo com os dados das Figuras 28 e 29 e Tabelas 17 e 18 verifica-se que a melhor forma de preservação do fungo por até um ano foi armazenar escleródios individualizados de *S. sclerotiorum* e manter os mesmos em, pois estes mantiveram 100% de sobrevivência e com o maior vigor (3).

Pratt (1992) citou que escleródios de *S. sclerotiorum* removidos de plantas doentes ou de meios de cultura mantêm-se viáveis por longos períodos a temperatura de 2-5°C. No presente trabalho, observou-se que após nove meses de avaliação, ocorreu diminuição gradativa na sobrevivência do fungo na temperatura de geladeira (5°C). Essa observação, permite concluir que a preservação nesta condição precisa de estudos por mais tempo para confrontar com as informações citados por Pratt (1992).

No presente trabalho, constatou-se que a preservação do fungo a temperatura ambiente não é eficaz, pois após um mês todos os escleródios de *S. sclerotiorum* morreram.

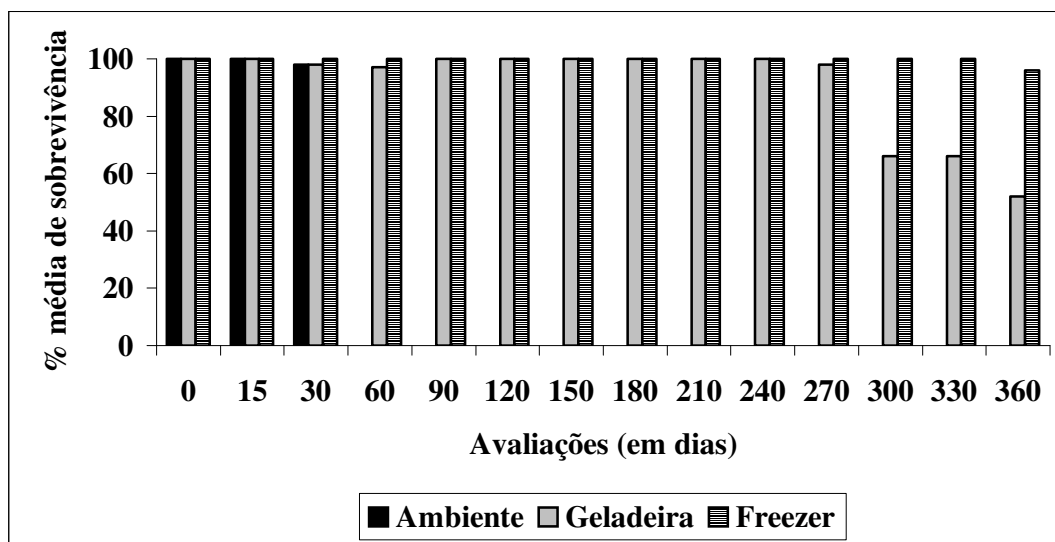


Figura 28. Sobrevivência de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de avaliação.

Tabela 17. Soma das freqüências de sobrevivência (vivos e mortos) de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* armazenados por um ano em condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer.

Tratamentos	Sobrevivência	
	Vivos	Mortos
Ambiente	298 ¹ (21,29 ²) c ³	1102 (78,71) a
Geladeira	1277 (91,21) b	123 (8,79) b
Freezer	1396 (99,71) a	4 (0,29) c

¹Freqüência de sobrevivência: vivos e mortos;

²Porcentagem de sobreviventes: vivos e mortos. Média de dez repetições;

³Freqüência seguida de mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Goodman (1964).

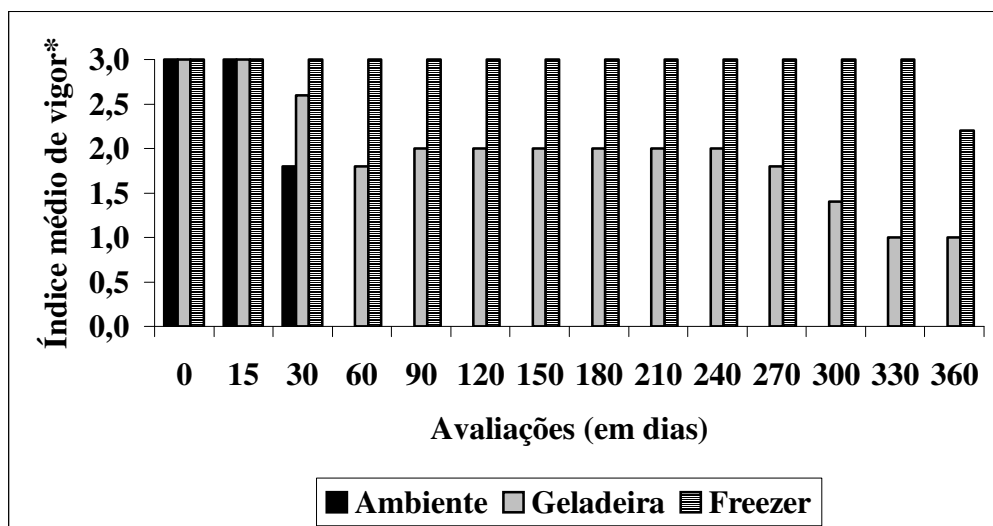


Figura 29. Vigor das colônias de *Sclerotinia sclerotiorum* crescidas a partir de escleródios submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de avaliação.

*Escala de notas (vigor): 0 – ausência de germinação; 1 – germinação de algumas estruturas; 2 – germinação de todas as estruturas com micélio pouco vigoroso; 3 – germinação de todas as estruturas com micélio vigoroso, mantendo as características de esporulação e de aparecimento de estruturas de resistência.

Tabela 18. Mediana e valores mínimo e máximo da semi-amplitude interquartílica da soma das notas do índice de vigor das colônias de *Sclerotinia sclerotiorum* crescidas a partir de escleródios submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de armazenagem.

Tratamentos			Resultado do teste estatístico
Ambiente	Geladeira	Freezer	
0 ¹ (0-30 ²) c ³	20 (10-30) b	30 (22-30) a	23,83 (P<0,01)

¹Mediana;

²Semi-amplitude interquartílica com os valores mínimo e máximo;

³Médiana seguida de mesma letra na linha não diferem entre si estatisticamente no nível de 5% de probabilidade de acordo com as comparações múltiplas de Norman & Streiner (1994).

6.3.6 *Verticillium dahliae*

Com base nos resultados das Figuras 30 e 31 e Tabelas 19 e 20 verifica-se que a melhor temperatura para manter a viabilidade dos microescleródios de *V. dahliae*, produzidos e armazenados até um ano na forma de substrato areno-orgânico, foi a de freezer, pois os microescleródios sobreviveram 100% e com maior vigor (3).

Segundo Melouk (1992), *V. dahliae* multiplicado em uma mistura de solo, perlita e turfa e mantido em temperatura de 5°C, pode ser preservado por 5 anos ou mais. No entanto, no presente trabalho, as estruturas de *V. dahliae* tiveram 94% de sobrevivência até um ano de armazenagem na temperatura de geladeira (5°C) contra 100% nas temperaturas de freezer (-20°C) e ambiente. Melouk (1992) citou o armazenamento de muitas espécies do gênero *Verticillium* a temperatura de 20°C em meio BDA, o que reforça os dados obtidos no presente trabalho para temperatura ambiente.

Dhingra & Sinclair (1995) relataram a preservação de culturas do fungo por alguns anos pelo método de Castellani.

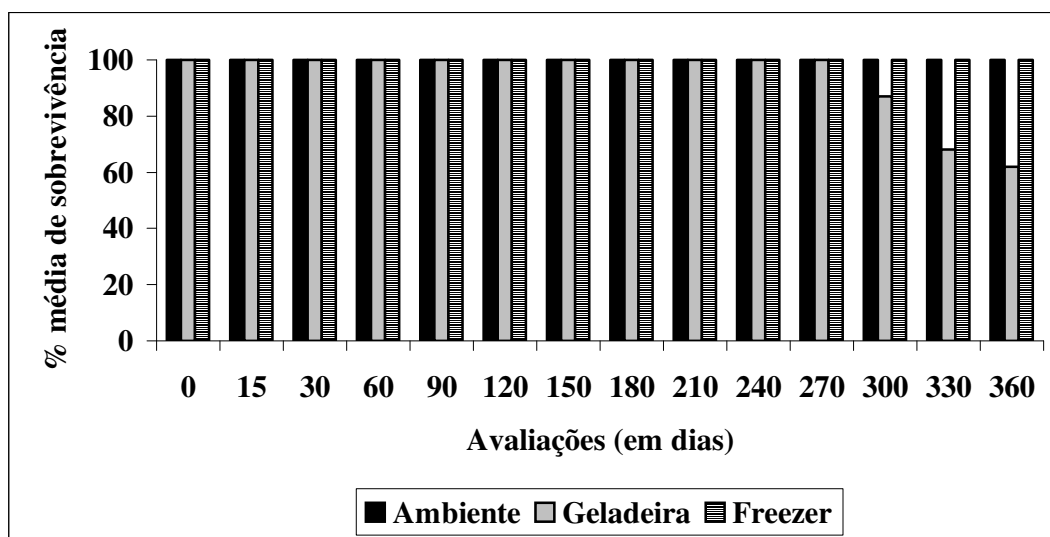


Figura 30. Sobrevivência de microescleródios de *Verticillium dahliae* submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de avaliação.

Tabela 19. Soma das freqüências de sobrevivência (vivos e mortos) de microescleródios de *Verticillium dahliae* armazenados por um ano em condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer.

Tratamentos	Sobrevivência	
	Vivos	Mortos
Ambiente	1400 ¹ (100,00 ²) a ³	0 (0,00) b
Geladeira	1317 (94,07) b	83 (5,93) a
Freezer	1400 (100,00) a	0 (0,00) b

¹Freqüência de sobrevivência: vivos e mortos;

²Porcentagem de sobreviventes: vivos e mortos. Média de dez repetições;

³Freqüência seguida de mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Goodman (1964).

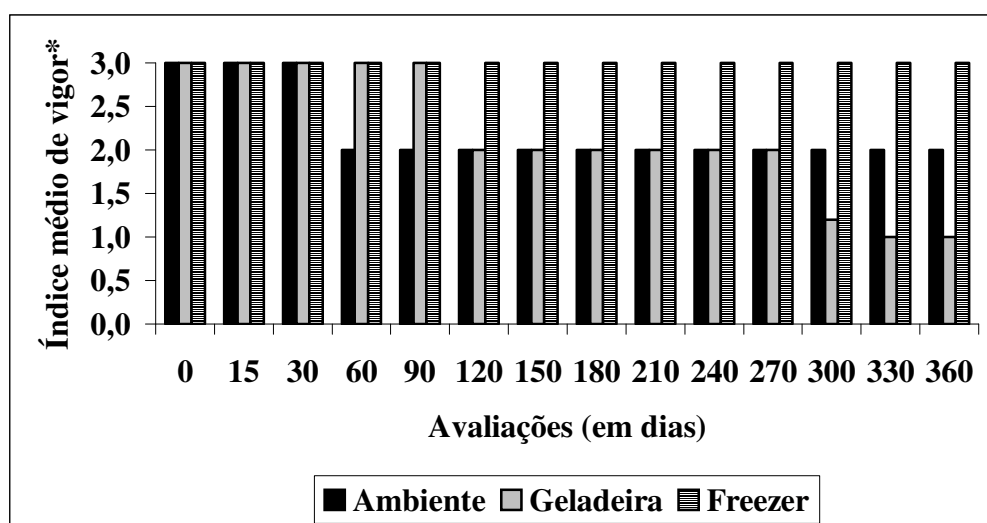


Figura 31. Vigor das colônias de *Verticillium dahliae* crescidas a partir de microescleródios submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de avaliação.

*Escala de notas (vigor): 0 – ausência de germinação; 1 – germinação de algumas estruturas; 2 – germinação de todas as estruturas com micélio pouco vigoroso; 3 – germinação de todas as estruturas com micélio vigoroso, mantendo as características de esporulação e de aparecimento de estruturas de resistência.

Tabela 20. Mediana e valores mínimo e máximo da semi-amplitude interquartílica da soma das notas do índice de vigor das colônias de *Verticillium dahliae* crescidas a partir de microscleródios submetidos às condições de temperatura ambiente, de geladeira e freezer, durante um ano de armazenagem.

Tratamentos			Resultado do teste estatístico
Ambiente	Geladeira	Freezer	
20 ¹ (20-30 ²) b ³	20 (10-30) b	30 (30-30) a	14,21 (P<0,01)

¹Mediana;

²Semi-amplitude interquartílica com os valores mínimo e máximo;

³Mediana seguida de mesma letra na linha não difere entre si estatisticamente a nível de 5% de probabilidade de acordo com as comparações múltiplas de Norman & Streiner (1994).

Com base nos resultados obtidos, constatou-se que a melhor condição de sobrevivência e vigor para as estruturas de resistência de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2, produzidas em pó de talco, ocorreu, de forma equânime, na temperatura de geladeira e de freezer; da mesma forma, para as estruturas de *M. phaseolina* e de *V. dahliae*, ambas formadas em substrato areno-orgânico, verificou-se esta melhor condição respectivamente, na temperatura de geladeira e de freezer, enquanto que para as estruturas de *S. rolfsii*, produzidas em BDA+oxitetraciclina e de *S. sclerotiorum*, em substrato feijão-fubá, observou-se tal condição na temperatura ambiente e de freezer, respectivamente.

6.4 Teste de patogenicidade

6.4.1 *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2

Com base nos dados da Figura 32 e Tabela 21 verifica-se que as estruturas do fungo mantiveram a patogenicidade em temperatura de geladeira ou de freezer, mas quando preservadas em temperatura de geladeira causam severidade da doença significativamente maior do que para as mantidas em temperatura de freezer. Estes dados mostram ser esta uma nova metodologia e uma nova alternativa de preservação para este fungo.

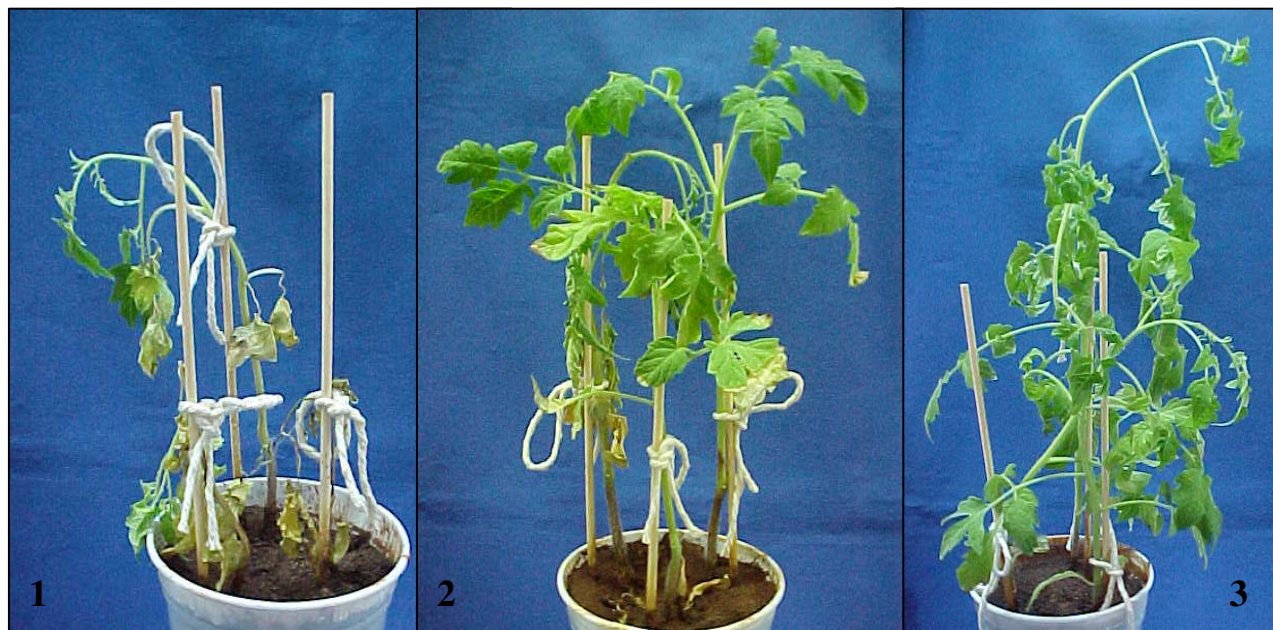


Figura 32. 1- Mudas de tomate do cultivar Kada inoculadas com esporos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2 preservado em talco e mantido em temperatura de geladeira;
 2 – Mudas de tomate do cultivar Kada inoculadas com esporos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2 preservado em talco e mantido em temperatura de freezer;
 3 - Mudas de tomate do cultivar Kada colocadas em água destilada (Testemunha).

Tabela 21. Severidade da doença causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2 em plantas de tomateiro do cultivar Kada.

Tratamentos		
Geladeira	Freezer	Testemunha
88 ^{1,*} a ²	69 b	0 c

¹Severidade da doença. Média de cinco repetições;

²Médias seguidas por mesma letra por tratamento não diferem estatisticamente pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. C.V.=9,12% e DMS=1,01.

*Escala de notas:

- 0 - plantas saudáveis sem sintomas externos ou internos no caule cortado na altura do primeiro internódio logo acima dos cotilédones;
- 20 - vasos coloridos na região do primeiro internódio sem outros sintomas visíveis;
- 40 - vasos coloridos até a altura da primeira folha com pelo menos um folíolo com amarelecimento;
- 60 - vasos coloridos até a metade do comprimento do caule, com duas ou mais folhas com amarelecimento;
- 80 - vasos coloridos até próximo ao ponteiro e maioria das folhas murchas com exceção do ponteiro;
- 100 - plantas mortas ou com vasos coloridos e folhas murchas até o ponteiro.

6.4.2 *Macrophomina phaseolina*

De acordo com os resultados do teste de patogenicidade (Figura 33 e Tabela 22) constata-se que os microescleródios de *M. phaseolina* podem ser preservados na forma de substrato areno-orgânico e em temperatura de geladeira por até um ano, pois as estruturas conservaram a patogenicidade, mostrando ser esta uma nova metodologia e uma nova alternativa de preservação para este fungo.



Figura 33. 1 – Plantas de feijão do cultivar Carioquinha inoculadas com palitos de madeira colonizados por *Macrophomina phaseolina* preservado em substrato areno-orgânico e mantido em temperatura de geladeira;
2 – Plantas de feijão do cultivar Carioquinha introduzidas com palitos de madeira não colonizados por *Macrophomina phaseolina* (Testemunha).

Tabela 22. Severidade da doença causada por *Macrophomina phaseolina* em plantas de feijão do cultivar Carioquinha.

Tratamentos	
Geladeira	Testemunha
6 ^{1,*}	0

¹Severidade da doença. Média de cinco repetições;

*Escala de notas:

- 1 - sem sintoma ao redor do ponto de inoculação;
- 2 - halo escuro ao redor do ponto de inoculação;
- 3 - comprimento da lesão menor que 0,5 cm;
- 4 - idem ao 3 com lesão de 1 cm;
- 5 - idem ao 3 com lesão entre 1 para 2 cm;
- 6 - idem ao 3 com lesão entre 2 para 4 cm;
- 7 - idem ao 3 com lesão entre 4 para 6 cm ou sem limite definido ou com pouco picnídio na base da lesão;

- 8 - comprimento da lesão com mais de 6 cm ou lesão sem limite definido com número de picnídios próximos à base do caule;
- 9 - caule com cor cinzenta e coberto com muitos picnídios.

6.4.3 *Sclerotium rolfsii*

Com base nos dados do teste de patogenicidade (Figura 34 e Tabela 23) verifica-se que apesar dos escleródios individualizados de *S. rolfsii* perderem 25,6% da sobrevivência após um ano em temperatura ambiente (Figura 26), os mesmos mantiveram a patogenicidade. Isto possibilita a preservação das estruturas deste fungo neste método desenvolvido por pelo menos um ano.



Figura 34. 1 – Plântulas de feijão do cultivar Carioquinha cujas sementes foram colocadas em contato com escleródios de *Sclerotium rolfsii* preservados em temperatura ambiente;
2 – Plântulas de feijão do cultivar Carioquinha cujas sementes não foram colocadas em contato com escleródios de *Sclerotium rolfsii* preservados (Testemunha).

Tabela 23. Severidade da doença causada por *Sclerotium rolfsii* em plântulas de feijão do cultivar Carioquinha.

Tratamentos	
Ambiente	Testemunha
1 ^{1,*}	0

¹Severidade da doença. Média de cinco repetições;

*Escala de notas:

0 - plântulas saudias e sem sintomas de necrose no colo;

1 - plântulas com necrose do solo;

2 - tombamento de pré e pós-emergência.

6.4.4 *Sclerotinia sclerotiorum*

Os escleródios de *S. sclerotiorum* produzidos em meio de feijão+fubá, individualizados e, posteriormente, mantidos até um ano em temperatura de freezer mantiveram a característica de patogenicidade (Figura 35 e Tabela 24). De acordo com os dados obtidos verifica-se ser esta uma nova metodologia e uma nova alternativa de preservação para este fungo por no mínimo um ano.

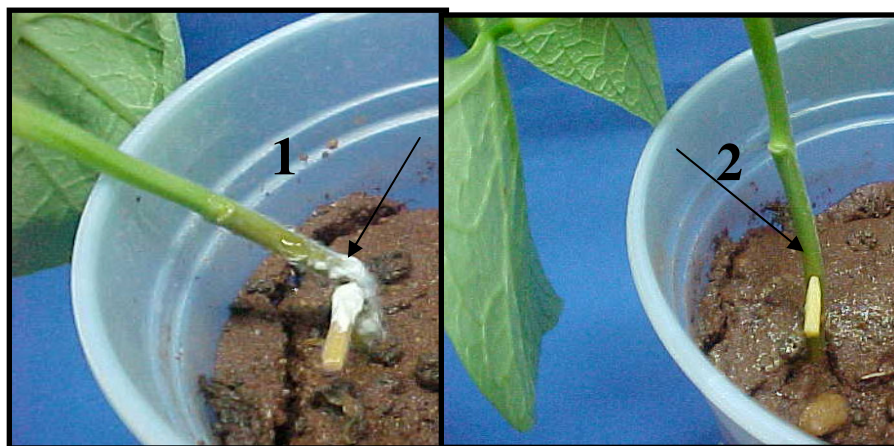


Figura 35. 1 – Plantas de feijão do cultivar Carioquinha inoculadas com palitos de madeira colonizados por *Sclerotinia sclerotiorum* mantida em temperatura de freezer;
2 – Plantas de feijão do cultivar Carioquinha inoculadas com palitos de madeira não colonizados pelo fungo (Testemunha).

Tabela 24. Severidade da doença causada por *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de feijão do cultivar Carioquinha.

Tratamentos	
Freezer	Testemunha
3 ¹	0

¹Severidade da doença (extensão da lesão, em cm). Média de cinco repetições.

6.4.5 *Verticillium dahliae*

Com base nos resultados obtidos de sobrevivência e vigor das colônias de *V. dahliae* (Figuras 30 e 31) constata-se que a metodologia desenvolvida propicia a preservação do fungo em substrato areno-orgânico desde que mantido em temperatura de freezer. No entanto, de acordo com os dados da Figura 36 e Tabela 25 verifica-se que a severidade da doença foi baixa, o que inviabiliza essa nova metodologia de preservação para este fungo, pois o mesmo perde a patogenicidade.

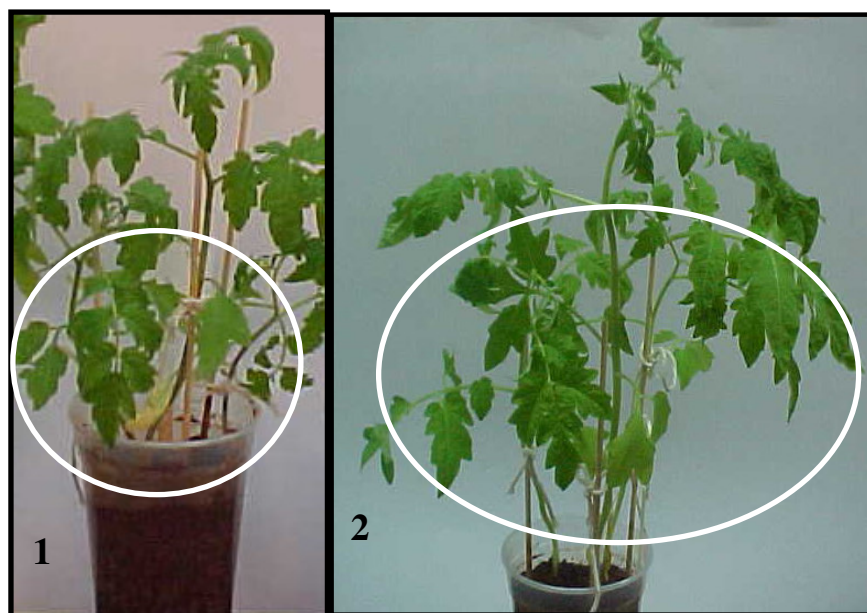


Figura 36. 1- Mudas de tomate do cultivar Kada inoculadas com esporos de *Verticillium dahliae* preservado em substrato areno-orgânico e mantido em temperatura de freezer;
2- Mudas de tomate do cultivar Kada colocadas em água destilada (Testemunha).

Tabela 25. Severidade da doença causada por *Verticillium dahliae* em mudas de tomate do cultivar Kada.

Tratamentos	
Freezer	Testemunha
11 ^{1,*}	0

¹Severidade da doença. Média de cinco repetições;

*Escala de notas:

- 0 - plantas sadias sem sintomas externos ou internos no caule cortado na altura do primeiro internódio logo acima dos cotilédones;
- 20 - vasos coloridos na região do primeiro internódio sem outros sintomas visíveis;
- 40 - vasos coloridos até a altura da primeira folha com pelo menos um folíolo com amarelecimento;
- 60 - vasos coloridos até a metade do comprimento do caule, com duas ou mais folhas com amarelecimento;
- 80 - vasos coloridos até próximo ao ponteiro e maioria das folhas murchas com exceção do ponteiro;
- 100 - plantas mortas ou com vasos coloridos e folhas murchas até o ponteiro.

Para *R. solani* GA4 HGI não foi feito o teste de patogenicidade, pois a metodologia desenvolvida de preservação não mostrou ser promissora, uma vez que os escleródios armazenados nas três temperaturas testadas morreram após cinco meses de avaliação (Figuras 24 e 25).

Os cinco fungos inoculados nas plantas (*F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2, *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii* e *V. dahliae*) foram reisolados, completando, assim, o postulado de Koch.

Segundo Dhingra & Sinclair (1995), não existe nenhum método universal para armazenar patógenos de plantas. Aparecido et al. (2001) mencionaram que o método de preservação deve manter as características originais dos patógenos como capacidade de esporular e patogenicidade.

Os dados obtidos no presente trabalho, abrem novas alternativas de preservação para *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2, *M. phaseolina*, *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum*. No entanto, novos trabalhos deverão testar essas novas alternativas de preservação para os fungos citados, por mais tempo de armazenagem, para confirmar a sua eficácia. As novas metodologias de preservação visaram ao armazenamento das estruturas de resistência dos fungos, o que assegurou a não ocorrência de modificações genéticas, pois, de acordo com Figueiredo & Pimentel (1975), quanto menor a atividade biológica

menor a possibilidade de ocorrerem modificações genéticas. Portanto, armazenar estruturas de resistência implica diretamente em menor atividade biológica dos fungos fitopatogênicos habitantes do solo.

Trabalhos envolvendo comparação de métodos de preservação precisam avaliar, além da sobrevivência, vigor e patogenicidade dos fungos, também a severidade da doença. A manutenção dessas características é vital na busca de novas alternativas de controle.

De acordo com Aparecido et al (2001), o método de preservação propicia a realização de pesquisas com patógenos a qualquer tempo.

Outro ponto importante é à busca de métodos de preservação que possuam baixo custo e que requeiram pouco espaço, o que foi contemplado pelos métodos propostos para *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2, *M. phaseolina*, *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum* no presente trabalho. Há métodos promissores relatados na literatura para alguns destes fitopatógenos estudados mas com alto custo de aquisição de equipamentos, tais como no método de congelamento, nitrogênio líquido e liofilização.

Outro ponto a ser ressaltado é que nos métodos de produção e preservação de estruturas de resistência dos fungos *Fusarium*, *Macrophomina*, *Sclerotinia* e *Sclerotium*, estudados no presente trabalho, pode-se ter, dentro do prazo de pelo menos um ano, inóculos em quantidade e qualidade padronizados de tal forma que a qualquer momento poder-se-ia utilizá-los.

O próximo passo deste estudo deve ser o desenvolvimento de procedimentos de inoculação, utilizando os métodos de produção e preservação do presente trabalho. O desenvolvimento destes procedimentos será fundamental para que se possa realizar diversos tipos de estudos em que a regularidade de aparecimento da doença seja garantida.

A produção, a avaliação da sobrevivência e a preservação das estruturas de resistência dos fungos fitopatogênicos habitantes do solo estudados, possibilitarão a realização de trabalhos de pesquisa com esses organismos, a qualquer tempo e local, eliminando-se a necessidade de se trabalhar com plantas hospedeiras e de se encontrarem áreas infestadas, naturalmente, com estes organismos. Desta forma, as metodologias desenvolvidas poderão auxiliar nos estudos com controle biológico,

solarização, incorporação de resíduos orgânicos, controle químico e outros, visando ao controle dos patógenos estudados.

7 CONCLUSÕES

- As metodologias desenvolvidas são eficientes na produção de estruturas de resistência e na avaliação da sobrevivência dos fungos fitopatogênicos habitantes do solo estudados, para condições de campo;
- A produção de clamidósporos de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2 em pó de talco e a manutenção das estruturas, sob temperatura de geladeira, é um método novo e eficiente de preservação, por até um ano;
- A produção de microescleródios de *M. phaseolina* em substrato areno-orgânico e a manutenção das estruturas, sob temperatura de geladeira, é um método novo e eficiente de preservação, por até um ano;
- A produção de escleródios de *R. solani* GA 4 HGI em substrato areno-orgânico e a manutenção das estruturas, sob as três temperaturas testadas, não é um método eficaz de preservação do fungo;
- A produção de escleródios individualizados de *S. rolfsii* na superfície do meio de BDA+oxitetraciclina e a manutenção das estruturas, sob temperatura ambiente, é um método novo e eficaz de preservação, por até um ano;

- A produção de escleródios individualizados de *S. sclerotiorum* em meio de feijão+fubá e a manutenção das estruturas, sob temperatura de freezer, é um método novo e eficiente de preservação, por até um ano;
- A produção de microescleródios de *V. dahliae* em substrato areno-orgânico e a manutenção das estruturas, sob temperatura de freezer, preserva a sobrevivência e o vigor do fungo, por até um ano, mas não assegura a patogenicidade.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBRÓSIO, M. M. Q.; BUENO, C. J.; SOUZA, N. L. Sobrevivência de *Macrophomina phaseolina* em solo incorporado com brócolos seguido de solarização. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 3, p. 364-370, 2004.

AMORIM, L. Sobrevivência do inóculo. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 246-266. V. 1: Princípios e conceitos.

APARECIDO, C. C.; EGYDIO, A. P. M.; FIGUEIREDO, M. B. Avaliação de três métodos para preservação de fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, n. 4, p. 421-424, 2001.

ARRUDA, S. C. Murcha de fusarium do tomateiro. **O Biológico**, São Paulo, v. 7, n. 7, p. 199-200, 1941.

AUSHER, R.; KATAN, J.; OVADIA, S. An improved selective medium for the isolation of *Verticillium dahliae*. **Phytoparasitica**, Rehovot, v. 3, n. 2, p. 133-137, 1975.

AYCOCK, R. Stem rot and other diseases caused by *Sclerotium rolfsii*. **North Carolina Agricultural Experimental Station Technical Bulletin**, Raleigh, n.174, 1966. 202 p.

BEDENDO, I. Damping off. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995c. p. 820-828. V. 1: Princípios e conceitos.

BEDENDO, I. Doenças vasculares. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995a. p. 838-847. V. 1: Princípios e conceitos.

BEDENDO, I. Podridões de raiz e colo. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995b. p. 829-837. V. 1: Princípios e conceitos.

BELL, D. K.; SUMNER, D. R. Survival of *Rhizoctonia solani* and other soilborne basidiomycetes in fallow soil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 71, n. 10, p. 911-615, 1987.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 376-379. V. 2: Doenças das plantas cultivadas.

BITANCOURT, A. A. Uma nova doença do feijão. **O Biológico**, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 41, 1935.

BLOK, W. J. Control of soilborne pathogens by inducing fermentative soil conditions. In: BLOK, W. J. (Ed.). **Early decline of asparagus in the Netherlands: etiology, epidemiology and management**. Wageningen: Wageningen Agricultural University, 1997. p. 125-144. Originalmente apresentada como tese.

BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 16, n. 2, p. 93-108, 1994.

BOURBOS, V. A.; SKOUDRIDAKIS, M. T. Soil solarization for the control of *Verticillium* wilt of greenhouse tomato. **Phytoparasitica**, Rehovot, v. 24, n. 4, p. 277-280, 1996.

BUENO, C. J. **Efeito da solarização do solo sobre população de *Pseudomonas* spp. fluorescente antagonista a *Rhizoctonia solani* Kuhn GA 4 HGI.** 2001. 71 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

BUENO, C. J.; AMBROSIO, M. M. Q.; SOUZA, N. L. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2, *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotium rolfsii* em microcosmo simulando solarização com prévia incorporação de couve (*Brassicae oleracea* var. *acephala* L.). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 3, p. 356-363, 2004.

BUENO, C. J. et al. Efeito direto e residual da solarização do solo no controle de *Verticillium dahliae* e de plantas infestantes na cultura da berinjela (*Solanum melongena* L.) em campo naturalmente infestado. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, n. 4, p. 445-450, 2000.

CARDOSO, J. E.; SILVA, S. A. G.; MARQUES, E. E. Controle químico e biológico das podridões radiculares do feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 39-44, 1997.

CARLING, D. E.; SUMNER, D. R. *Rhizoctonia*. In: SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. (Ed.). **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1992. p.157-165.

CEREZINE, P. C. **Murcha de *Verticillium* em tomateiro: variabilidade do patógeno e comportamento de variedades.** 1989. 80 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1989.

CERESINI, P. C.; SOUZA, N. L. Associação de *Rhizoctonia* spp. binucleadas e de *R. solani* Kühn GA 4 HGI e GA 2-2 IIIB ao feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 14-24, 1997.

CHAVES, K. C.; COSTA, J. L. da S. Influência do método de inoculação e da quantidade de inóculo de *Sclerotium rolfsii* na severidade de podridão do colo do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 25, n. 4, p. 298-302, 1999.

CLOUD, G. L. Comparison of three media for enumeration of sclerotia of *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 75, n. 8, p. 771-772, 1991.

COELHO NETTO, R. A.; DHINGRA, O. D. Method for evaluating bean genotype reaction to *Macrophomina phaseolina*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 236-242, 1996.

COLEY-SMITH, J. R.; COOKE, R. C. Survival and germination of fungal sclerotia. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 9, p. 65-92, 1971.

DAVEY, C. B.; PAPAIVIZAS, G. C. Saprophytic activity of *Rhizoctonia* as affected by the carbon-nitrogen balance of certain organic soil amendments. **Soil Scientific Society American Proceeding**, Madison, v. 27, p. 164-167, 1963.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434 p.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina***. Viçosa: UFV, 1978. 166 p.

FARR, D. F. et al. **Fungi on plants and plant products in the United States**. St Paul: The American Phytopathological Society, 1989. 1252 p.

FENILLE, R. C. **Influência da incorporação de materiais orgânicos e da umidade do solo na patogenicidade de *Rhizoctonia solani* Kühn GA 4 HGI ao feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1997. 82 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1997.

FERRAZ, L. C. L. **Biologia de *Sclerotinia sclerotiorum* e aspectos de controle cultural de mofo-branco em feijoeiro**. 1996. 202 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 1996.

FERRAZ, L. C. L. **Práticas culturais para o manejo de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em feijoeiro**. 2001. 154 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

FERRAZ, L. C. L.; CAFÉ FILHO, A. C. Efeito da adição de fubá no meio de produção de escleródios e outros fatores influenciando na formação de apotécios de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 3, p. 364-369, 1998.

FIGUEIREDO, M. B.; PIMENTEL, C. P. V. Métodos utilizados para conservação e fungos na micoteca da seção de micologia fitopatológica do instituto biológico. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 1, n. 4, p. 299-302, 1975.

FRANCL, L. J. et al. Effects of three soil types on potato early dying disease and associated yield reduction. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 2, p. 159-166, 1988.

FREEMAN, S.; GINZBURG, C.; KATAN, J. Heat shock protein synthesis in propagules of *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*. **Phytopathology**, St. Paul. v. 79, n.10, p.1054-1058, 1989.

GARRETT, S. D. Decomposition of cellulose in soil by *Rhizoctonia solani* Kühn. **Transaction British Mycology Society**, Cambridge, v. 45, p. 115-120, 1962.

GHINI, R.; BETTIOL, W.; SOUZA, N. L. Solarização do solo para o controle de *Verticillium dahliae* em berinjela. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 4, p. 384-388, 1992.

GHINI, R.; BETTIOL, W.; CALDARI JR., P. Solarização do solo para controle de *Sclerotium rolfsii* em feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 143-145, 1997.

GOODMAN, L. A. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. **Annals of Mathematical Statistics**, Beachwood, v. 35, n. 2, p. 716-725, 1964.

HAWKSWORTH, D. L. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi**. New York: CAB International, 1995. 616 p.

HINZ, R. H. **Germinação de microconídios de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (E.F.Smith) Snyder & Hansen em areia incorporada com manipueira**. 1991. 49 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1991.

KEINATH, A. P.; FARNHAM, M. W. Differential cultivars and criteria for evaluating resistance to *Rhizoctonia solani* in seedling *Brassica oleracea*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n. 8, p. 946-952, 1997.

KENDIG, S. R.; RUPE, J. C.; SCOTT, H. D. Effect of irrigation and soil water stress on densities of *Macrophomina phaseolina* in soil and roots of two soybean cultivars. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, n. 8, p. 895-900, 2000.

KIMATI, H. Doenças do feijoeiro. In: GALLI, F. (Coord.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. Cap. 19, p. 297-318.

KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, 774 p.

KO, W.; HORA, F. K. A selective medium for *Rhizoctonia solani* in soil. **Phytopathology**, St. Paul, v. 61, n. 6, p. 707-710, 1971.

KOMADA, H. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. **Review of Plant Protection Research**, Tokyo, v. 8, p. 114-124, 1975.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças das solanáceas. In: KIMATI, H. et al. (Ed.) **Manual de fitopatologia**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p. 665-675. v.2: Doenças das plantas cultivadas.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H. et al. (Ed.) **Manual de fitopatologia**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p. 690-719. v.2: Doenças das plantas cultivadas.

LARKIN, R. P.; HOPKINS, D. L.; MARTIN, F. N. Ecology of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in soils suppressive and conducive to Fusarium wilt of watermelon. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 10, p. 1105-1116, 1993.

LEFEVRE, A. F. V. **Determinação da temperatura letal para *Rhizoctonia solani* Kühn e *Sclerotium rolfsii* Sacc. e efeitos da solarização sobre algumas variáveis do solo**. 1990. 94f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas). Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1990.

LOCKWOOD, J. L. **Curso avançado sobre fitopatógenos do solo**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 1977. 41 p.

LODHA, S.; SHARMA, S K.; AGGARWAL, R. K. Solarization and natural heating of irrigated soil amended with cruciferous residues for improved control of *Macrophomina phaseolina*. **Plant Pathology**, London, v. 46, n. 2, p. 186-190, 1997.

MATSUMOTO, M. N. et al. Efeito do substrato de cultivo na produção de escleródios e na patogenicidade de *Sclerotium rolfsii*. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 91-94, 2000.

MELOUK, H. A. Verticillium. In: SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. (Ed.). **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1992. p. 175-178.

MEYER, W. A.; SINCLAIR, J. B.; KHARE, M. N. Biology of *Macrophomina phaseolina* in soil studied with selective media. **Phytopathology**, St. Paul, v. 63, n. 5, p. 613-620, 1973.

MICHEREFF FILHO, M. et al. Influência de tipos de solo do estado de Pernambuco na intensidade da doença induzida por *Rhizoctonia solani* em feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 1, p. 19-25, 1996.

MIHAIL, J. D. *Macrophomina*. In: SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. (Ed.). **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1992. p. 134-136.

MIHAIL, J. D.; ALCORN, S. M. Effects of soil solarization on *Macrophomina phaseolina* and *Sclerotium rolfsii*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 68, n. 2, p. 156-159, 1984.

MINUTO, A.; MIGHELI, Q.; GARIBALDI, A. Evaluation of antagonistic strains of *Fusarium* spp. in the biological and integrated control of Fusarium wilt of cyclamen. **Crop Protection**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 221-226, 1995.

MINUTO, A. et al. Effect of antagonistic *Fusarium* spp. and different commercial biofungicide formulations on Fusarium wilt of basil (*Ocimum basilicum* L.). **Crop Protection**, Oxford, v. 16, n. 8, p. 765-769, 1997.

NASSER, L. C. B.; BOLAND, G. J.; SUTTON, J. C. Novo método de produção massal de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, Suplemento, p. 376. 1995. Resumo.

NORMAN, G. R.; STEINER, D. L. **Biostatistics: the bare essentials**. St Louis: Ed. Mosby Boor, 1994. 260 p.

OLAYA, G.; ABAWI, G. S.; BARNARD, J. Influence of water potential on survival of sclerotia in soil and on colonization of bean stem segments by *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, n. 12, p. 1351-1354, 1996.

PAPAVIZAS, G. C.; DAVEY, C. B. Isolation of *Rhizoctonia solani* Kühn from naturally infested and artificially inoculated soils. **Plant Disease Report.**, St. Paul, v. 43, p. 404-410, 1959.

PAPAVIZAS, G. C.; DAVEY, C. B. Saprophytic behavior of *Rhizoctonia* in soil. **Phytopathology**, St. Paul., v. 51, n. 5, p. 693-699, 1961.

PAVAN, M. A.; KUROZAWA, C. Comportamento de algumas cultivares e progênies de tomateiro às raças 1 e 2 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (WR) Snyder & Hansen. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 7, n.3-4, p. 57-62, 1981.

PIMENTEL, C. P. V.; PITTA, G. B. P.; FIGUEIREDO, M. B. Preservação da patogenicidade de alguns fungos conservados em água destilada. **O Biológico**, São Paulo, v. 46, n. 12, p. 279-308, 1980.

PRATT, R. G. Sclerotinia. In: SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. (Ed.). **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1992. p. 74-78.

PUHALLA, J. E.; MAYFIELD, J. E. The mechanism of heterokaryotic growth in *Verticillium dahliae*. **Genetics**, Bethesda, v. 76, n. 3, p. 411-422, 1974.

PUNJA, Z. K. The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 23, p. 97-127, 1985.

PUNJA, Z. K.; RAHE, J. E. Sclerotium. In: SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. (Ed.). **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1992. p. 166-170.

PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution and impact. **Phytopathology**, St. Paul, v. 69, n. 8, p. 875-880, 1979.

RESENDE, M. L. V.; ZAMBOLIM, L. Eficiência de métodos utilizados para quantificação da população de escleródios de *Sclerotium cepivorum* Berk. no solo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, n. 3, p. 493-500, 1986.

SHURTLEFF, M. C.; AVERRE III, C.W. **The plant disease clinic and field diagnosis of abiotic diseases**. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1997. 245 p.

SIEGEL, S.; CASTELLAN JR., N. J. **Non parametric statistics for the behavioral sciences**. 2. ed. New York: McGraw-Hill, 1988. 312 p.

SILVA, S. da. et al. Sensibilidade térmica e micelial e esclerocial de isolados de *Rhizoctonia solani* GA 4 HGI. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 22, n. 3-4, p. 252-256, 1996.

SILVEIRA, A. P.; MENDONÇA, N. T.; CRUZ, B. P. B. Considerações sobre resistência varietal do tomateiro à murcha de *Fusarium*. **O Biológico**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 35-37, 1967.

SILVEIRA, N. S. S. et al. Potencial de isolados de *Trichoderma* sp. no controle de *Sclerotium rolfsii* em feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 20, n. 1, p. 22-25, 1994.

SINCLAIR, J. B.; BACKMAN, P. A. (Ed.). **Compendium of soybean disease**. 3. ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1989. 116 p.

SMITH, W. H. Comparison of mycelial and sclerotial inoculum of *Macrophomina phaseolina* in the mortality of oine seedlings under varying soil conditions. **Phytopathology**, St. Paul, v. 59, n. 3, p. 379-382, 1969.

SOUZA, N. L.; BUENO, C. J. Controle de clamidósporos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2 e escleródios de *Sclerotium rolfsii* em solo solarizado incorporado com matéria orgânica. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 29, n. 2, p. 153-160, 2003.

STEADMAN, J. R. Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, St. Paul, v. 69, n. 8, p. 904-907, 1979.

SUGUINO, E.; MARINGONI, A. C. Comportamento de variedades de feijoeiro a *Rhizoctonia solani*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 21, n. 2, p. 124-126, 1995.

TERMORSHUIZEN, A. et al. Interlaboratory comparison of methods to quantify microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil. **Applied-Environmental-Microbiology**, Washington, v. 64, n. 10, p. 3846-3853, 1998.

TOKESHI, H. et al. Control of *Sclerotinia sclerotiorum* with effective microorganisms. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 146-154, 1997.

VIANA, F. M. P. **Influência de fatores físicos e de material orgânico na germinação de microescleródios de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goindanich.** 1996. 100 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1996.

VIANA, F. M. P. et al. Controle do tombamento de plântulas de feijoeiro causada por *Sclerotinia sclerotiorum* com a incorporação de matéria orgânica ao substrato. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 94-97, 2000.

VIENNOT-BOURGIN, G. **Les champignons parasites des plantes cultivées.** Paris: Masson, 1850. 1949 p.

WINDELS, C. E. Fusarium. In: SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. (Ed.). **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi.** St. Paul: The American Phytopathological Society, 1992. p. 115-128.