



**POLIANA PATRÍCIA LIMA**

**MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E  
LOCALIZAÇÃO DE INÓCULO DE  
*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* EM  
SEMENTES DE FEIJÃO**

**LAVRAS – MG**

**2015**

**POLIANA PATRÍCIA LIMA**

**MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E LOCALIZAÇÃO DE INÓCULO DE  
*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* EM SEMENTES DE FEIJÃO**

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

Orientador: PhD. José da Cruz Machado

**LAVRAS - MG**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Lima, Poliana Patrícia.

Métodos de inoculação e localização de *Fusarium oxysporum* f.  
sp. *phaseoli* em sementes de feijão / Poliana Patrícia Lima. – Lavras  
: UFLA, 2015.

56 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de  
Lavras, 2015.

Orientador(a): José da Cruz Machado.

Bibliografia.

1. Phaseolus vulgaris. 2. métodos de inoculação. 3. murcha de  
fusarium. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**POLIANA PATRÍCIA LIMA**

**MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E LOCALIZAÇÃO DE INÓCULO DE  
*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* EM SEMENTES DE FEIJÃO**

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

APROVADA, 27 de Fevereiro de 2015.

Dr. Mario Sobral de Abreu

UFLA

Dra. Enia Mara de Carvalho

UBM

Dr. José da Cruz Machado

Orientador

**LAVRAS – MG**

**2015**

*Aos meus pais Joaquim e Luzia pelo apoio e amor incondicional.  
A minha irmã Vanessa pela amizade e companheirismo de sempre.*

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pela vida e por todas as manhãs.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia pela oportunidade concedida de realizar um sonho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José da Cruz Machado, pelos ensinamentos e pela oportunidade.

Aos mestres pelos ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora Dra. Enia e Dr. Mario Sobral.

À família do Laboratório de Patologia de sementes: Mirella, Sueny, Bárbara, Marina, Carol, Thiago, Stélio, Carla, Ângela, Mirian, Elenice e Bruno pela ajuda na condução dos experimentos, pelos conselhos, pela amizade e pelas conversas do dia-a-dia. Em especial a Iara pela amizade e contribuição de sempre desde antes do início e até mesmo longe.

À Marcella pela grande colaboração, amizade e ensinamentos.

Aos amigos de Lavras, em especial Gizeli e Acleide, e as amigas de república, por tornarem a caminhada mais fácil e agradável.

Aos amigos de Alpinópolis e Alfenas que mesmo estando longe se fizeram presentes.

Aos meus pais e irmã por depositarem tanta confiança em mim e fazerem com que eu acreditasse que seria possível.

À minha família pelo apoio e carinho e a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão desse trabalho.

## RESUMO

A murcha de fusarium, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*) é um dos principais fatores que contribuem para a redução da produtividade do feijoeiro e que pode ser disseminada e transmitida por sementes infectadas e/ou contaminadas. A obtenção de sementes naturalmente infectadas é uma das dificuldades para a realização de estudos com o referido patógeno em sementes de feijão, tornando-se necessário recorrer a inoculação artificial, que pode ser realizada por diferentes métodos. O objetivo neste trabalho foi comparar métodos de inoculação artificial e verificar a presença do inóculo de *Fop* nas diferentes partes das sementes (tegumento, cotilédone e eixo embrionário). O trabalho foi realizado utilizando sementes da cultivar BRS Estilo e o isolado *Fop* 07, da coleção de micologia da UFLA, inoculado por três métodos diferentes: 1- embebição das sementes em suspensão aquosa com três concentrações e durante cinco períodos de tempo, 2 – contato das sementes com o patógeno em meio sólido agarizado sem restrição hídrica por cinco períodos e 3- contato das sementes com o patógeno em meio sólido agarizado com restrição hídrica por seis períodos de tempo. Pelos resultados, foi observado que o método com restrição hídrica possibilitou sementes com potenciais de inóculo distintos e mais elevados sem afetar significativamente a qualidade inicial das sementes. Por este método foi evidenciado que *Fop* pode colonizar o eixo embrionário das sementes causando a morte destas na fase de pré-emergência.

## ABSTRACT

The fusarium wilt, caused by *Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli* (*Fop*) is one of the main factors contributing to the reduction of common bean yield and the pathogen can be disseminated and transmitted by infected and / or contaminated seeds. Obtaining naturally infected seeds is one of the difficulties in practice to develop studies with the referred to pathogen in bean seeds, making it necessary to use artificial inoculation, which may be accomplished by different methods. The objective in this study was to compare methods of artificial inoculation and to verify the presence of *Fop* inoculum in different parts of the seed (seed coat, cotyledon and embryo axis). The study was conducted using seeds of BRS Style and isolate *Fop* 07, from the Mycological Collection of UFLA, and inoculation performed by three different methods: 1- soaking the seeds in water suspension with three inoculum concentrations and for five time periods, 2 - contact of seeds with the pathogen on solid agar medium without water restriction for five periods and 3- contact of seeds with the pathogen on solid agar medium with water restriction for six periods of time. From the results, it was observed that the method involving water restriction in the agar substrate produced seeds with different and higher inoculum potentials without affecting significantly the initial quality of the seeds. By this method it was shown that *Fop* may colonize the embryo of the seeds, causing the death of these in pre-emergence phase.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>A cultura do feijão.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2</b>	<b>Aspectos gerais da murcha de fusarium em feijoeiro e seu agente causal.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3</b>	<b>Associação de fitopatógenos com sementes .....</b>	<b>14</b>
<b>2.4</b>	<b>Ocorrência e efeitos de <i>Fop</i> em sementes de feijão .....</b>	<b>16</b>
<b>2.5</b>	<b>Métodos de inoculação de fungos em sementes .....</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Obtenção, multiplicação e checagem da patogenicidade do isolado de <i>F. oxysporum</i> f. sp <i>phaseoli</i> (<i>Fop</i>) .....</b>	<b>20</b>
<b>3.3</b>	<b>Procedimentos de inoculação do fungo nas sementes .....</b>	<b>21</b>
3.3.1	Inoculação pela embebição das sementes.....	22
3.3.2	Inoculação pelo contato das sementes com a colônia do patógeno em meio de cultura sólido .....	23
3.3.3	Inoculação pelo contato das sementes com a colônia do patógeno em substrato sólido modificado com restritor hídrico .....	23
<b>3.4</b>	<b>Avaliações .....</b>	<b>24</b>
3.4.1	Germinação .....	24

3.4.2	Condutividade Elétrica .....	24
3.4.3	Índice de velocidade de emergência (IVE), estande inicial e final...	25
3.4.4	Índice de doença .....	26
3.4.5	Verificação da presença de inóculo de <i>Fop</i> nos tecidos das sementes inoculadas .....	27
<b>3.5</b>	<b>Delineamento experimental.....</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1</b>	<b>Teste de Patogenicidade.....</b>	<b>29</b>
<b>4.2</b>	<b>Desempenho das sementes inoculadas pelo método de embebição .....</b>	<b>29</b>
<b>4.3</b>	<b>Desempenho das sementes inoculadas pelo método de contato com o patógeno sem a presença de restritor hídrico.....</b>	<b>32</b>
<b>4.4</b>	<b>Desempenho das sementes inoculadas pelo método de contato com o patógeno na presença de restritor hídrico .....</b>	<b>34</b>
<b>4.5</b>	<b>Localização do inóculo de <i>Fop</i> nos tecidos das sementes inoculadas..</b>	<b>36</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>43</b>
	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>43</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior país produtor e consumidor de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) do mundo (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2013), com uma produção anual de 3442.200 toneladas, sendo o Paraná o maior estado produtor, seguido por Minas Gerais (ANUÁRIO..., 2015). Dentre os principais fatores que limitam a produtividade do feijoeiro estão as doenças sendo a murcha de fusarium, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*), uma das mais importantes nesta cultura. A doença tem merecido atenção especial no Brasil nos últimos anos devido ao aumento da disseminação do patógeno em consequência de maior mecanização nos campos de produção, plantações sucessivas com dois ou três ciclos de feijoeiro por ano, sistema de irrigação (PEREIRA; RAMALHO; ABREU, 2009) e uso de sementes não certificadas.

Uma das principais formas de disseminação do *Fop*, que é um patógeno de solo é através de sementes infectadas e/ou contaminadas. Devido a essa disseminação, o nível de tolerância de *Fop* em sementes de feijão no Brasil, proposto pela Comissão Nacional de Controle de Qualidade Sanitária de Sementes tem sido zero, em amostras de 400 sementes, a fim de evitar a disseminação do inóculo por esta via (BRASIL, 1992).

Para auxiliar os estudos do patossistema *Fop* em sementes de feijão há necessidade de se dispor sementes com variáveis níveis de inóculo, em termos de incidência e potencial de inóculo (COSTA et al., 2003). Neste sentido existem dificuldades de se obter sementes naturalmente infectadas, sendo necessário recorrer a inoculação artificial. É importante ressaltar que para a definição de um método de inoculação é necessário que haja a reprodução da

sintomatologia típica da doença (TANAKA; MENTEN, 1991; TANAKA; MENTEN; MARIANNO, 1989).

Para a maioria dos patógenos associados às sementes, os métodos de inoculação têm sido desenvolvidos por meio de imersão de sementes em suspensão de esporos e/ou hifas (AGARWAL & SINCLAIR, 1987; TANAKA & MENTEN, 1991) e pelo contato das sementes com a colônia fúngica desenvolvida em meios de cultura convencionais (ALBUQUERQUE, 2000; SANTOS, 1995; TANAKA; MENTEN; MARIANNO, 1989). No entanto a possível germinação das sementes nas condições do processo de inoculação faz com que o tempo de contato das sementes com o patógeno seja reduzido, e assim não garantindo níveis diferenciados de inóculo nos tecidos das sementes (MACHADO et al., 2001; TANAKA; MENTEN, 1991). A inoculação das sementes através da técnica de condicionamento osmótico, proposto inicialmente por Carvalho (1999), vem se destacando nesse âmbito, pois, devido à presença de um restritor hídrico no meio de cultura, a germinação das sementes é paralisada à medida que entram em equilíbrio com o potencial osmótico da solução no substrato (TANAKA e MACHADO, 1985).

Em trabalho mais recente realizado por Sousa et. al (2015), utilizando a inoculação das sementes pela técnica de condicionamento osmótico e marcador GFP, foi possível verificar que *Fop* pode associar-se às sementes de feijão externamente e atingir o tegumento, com penetração das hifas até o embrião. A referida técnica possibilitou o preparo de amostras de sementes de feijão com níveis de incidência e potencial de inóculo diferenciados de *Fop* e assim tornando possível propor um protocolo para detecção específica de isolados deste fungo em amostras de sementes de feijão.

Neste trabalho, o alvo foi avaliar a eficácia de métodos de inoculação de sementes de feijão e verificar a localização de *Fop* no interior das sementes inoculadas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A cultura do feijão

O feijão (*Phaseolus vulgaris L.*) é uma das leguminosas de maior importância na alimentação mundial (SCHWARTZ et al., 2005), sendo amplamente consumida em todo o mundo e considerada uma boa fonte de proteína, fibra, algumas vitaminas e minerais, e além desses componentes nutricionais, é rica em fitoquímicos benéficos para a saúde (CAMPOS-VEGA et al., 2013).

Cultivado por pequenos e grandes produtores, em diversificados sistemas de produção e em todas as regiões brasileiras, o feijoeiro comum reveste-se de grande importância econômica e social (AIDAR, 2003), sendo o Brasil o maior produtor mundial (FAO, 2013) com uma produção anual de 3.442.200 toneladas (ANUÁRIO..., 2015) e além de maior produtor também é o maior consumidor do grão no mundo (FAO, 2013). O estado do Paraná é o maior produtor nacional seguido por Minas Gerais, com uma produção de 814.00 e 596.000 toneladas, respectivamente (ANUÁRIO..., 2015).

O ciclo de vida do feijoeiro varia entre 65-100 dias, dependendo do cultivar e dos fatores ambientais como temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluvial (AIDAR, 2003; SCHWARTZ et al., 2005). O sistema de irrigação em alguns campos no Brasil, bem como práticas inadequadas aumenta a ocorrência de muitas doenças, como murcha-de-fusarium em feijoeiro, onde segundo a literatura, as sementes infectadas são a principal fonte de disseminação do patógeno em longas distâncias (SANTOS et al., 1996; SCHWARTZ et al., 2005).

## 2.2 Aspectos gerais da murcha de fusarium em feijoeiro e seu agente causal

O primeiro registro da murcha-de-fusarium em feijoeiro foi na Califórnia - EUA em 1928, sendo encontrada mais tarde em diversos outros países, inclusive no Brasil (PASTOR-CORRALES; ABAWI, 1987), onde sua importância se dá devido à falta de rotação de cultura, cultivo intensivo de feijão durante o ano e à grande movimentação de implementos entre campos de cultivo (PEREIRA; RAMALHO; ABREU, 2009).

A murcha de fusarium é causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*) que é disseminado principalmente através de sementes contaminadas, com esporo aderido à superfície das mesmas (SANTOS et al., 1996; SCHWARTZ et al., 2005). A infecção do feijoeiro por *Fop* ocorre pelas raízes e hipocótilos, mais comumente através de ferimentos. Os sintomas iniciais são amarelecimento e senescência prematura das folhas, passando das inferiores para as superiores, progredindo para sintomas cloróticos até as folhas atingirem uma coloração amarelo-brilhante, seguido por murcha e descoloração da folhagem. Quando as plantas infectadas são jovens pode ocorrer redução de seu desenvolvimento e tornarem-se atrofiadas fazendo ainda com que os tecidos vasculares adquiram uma coloração marrom-avermelhada (SCHWARTZ et al., 2005). Devido à presença e atividade do patógeno nos vasos do xilema, infecções mais severas podem provocar a morte das plantas inteiras dentro de algumas semanas (AGRIOS, 2005).

A temperatura ótima para o desenvolvimento da doença é de 20°C, sendo os danos agravados por níveis extremos de umidade do solo, além dos efeitos da compactação e drenagem pobre do solo (SCHWARTZ et al., 2005).

A utilização de sementes de boa qualidade e saudáveis associadas com rotação de culturas e diminuição da compactação do solo são, portanto,

importantes medidas para a diminuição do inóculo e controle da murcha-de-fusarium (JENSEN; KURLE; PERCICH, 2004; TOLEDO-SOUZA et al., 2012). O uso de cultivar resistente também pode ser utilizado, no entanto, é necessário o conhecimento prévio da raça do patógeno presente no local para se tomar decisão correta em relação a escolha da cultivar (ALVES-SANTOS et al., 2002b).

As características morfológicas de *F. oxysporum* incluem a produção de microconídios em falsas cabeças com monofiálides curtas, produção de clamidosporos e o formato dos macro e microconídios, onde os macroconídios possuem comprimento de curto a médio, paredes finas, ligeiramente curvos, normalmente com três septos e os microconídios podem possuir forma oval, elíptica ou reniforme e geralmente sem septos (LESLIE; SUMMERELL, 2006), alcançando o crescimento micelial máximo em meio de cultura com uma temperatura em torno de 28 ° C (SCHWARTZ et al., 2005).

### **2.3 Associação de fitopatógenos com sementes**

As sementes são componentes essenciais para a produção de alimento para a população de diversos países, sendo que 90% das lavouras agrícolas dependem desta forma de propagação. No entanto, muitas doenças são causadas por patógenos veiculados por sementes, e para alguns deles é o único meio de sobreviver entre safras e por longos períodos. A infecção de sementes pode ocorrer de forma sistêmica, onde o patógeno segue a rota do sistema vascular e entra nas sementes através do funículo, estando nesse grupo a maioria dos patógenos causadores de murcha vascular, (NEERGARD, 1979).

A associação de microrganismos com sementes é de fundamental importância devido aos danos que eles podem provocar às plantas oriundas destas, além de afetar a quantidade e a qualidade do produto final. Estruturas do

patógeno presente nas sementes constituem o inóculo primário para o desenvolvimento de epidemias e este inóculo fica viável por um longo período, quando estas sementes são armazenadas (MACHADO, 1988).

De acordo com Machado (2012) os efeitos de patógenos na qualidade das sementes são variáveis e podem ser percebidos durante o processo de germinação e nas fases subsequentes do desenvolvimento das plantas. Entre as consequências relacionadas com a associação de patógenos à semente, estão a perda do poder germinativo e vigor das mesmas, aumento da suscetibilidade de plantas a estresses variados, introdução aleatória e precoce de inóculo nas áreas de cultivo, morte de plântulas originadas de sementes contaminadas, acúmulo de inóculo no solo, contaminação e possível inutilização do solo por longos períodos, contaminação de equipamentos de beneficiamento de sementes, disseminação do patógeno a longas distâncias, queda de produção e qualidade, entre outros. Os danos provocados podem variar com o potencial e posição do inóculo desses agentes nas sementes e também de acordo com patógeno ou grupo de patógenos.

A transmissão de patógenos através de sementes, deve ser avaliada sob dois aspectos gerais, uma vez que os danos são variáveis. O primeiro aspecto está relacionado ao campo de produção, restringindo seus efeitos à redução de rendimento, sem afetar a viabilidade das sementes, e o segundo, além dos patógenos reduzirem o rendimento, apresentam efeitos danosos sobre a semente, quando colonizam o embrião. Desta forma, ocorrem reduções na porcentagem de germinação e vigor (CARVALHO, 1999). De acordo com Neergaard (1979), a morte de sementes e o tombamento, em função de patógenos transportados pelas sementes, ocorrem principalmente sob condições desfavoráveis à emergência das plântulas.

## 2.4 Ocorrência e efeitos de *Fop* em sementes de feijão

Sementes contaminadas podem disseminar patógenos em longas distâncias, como qualquer outro vetor, com a vantagem de ter um contato direto com o hospedeiro suscetível. Entretanto, a transmissão do patógeno para a planta oriunda da semente contaminada é determinada por alguns fatores, dentre eles o potencial de inóculo, posição na semente e o tempo de infecção (MACHADO & POZZA, 2005).

Em sementes com a presença de sinais do fungo, infecções fracas são normalmente restritas a casca e ao pericarpo da semente, ao passo que a infecção mais forte pode invadir todas as partes, incluindo o embrião. As infecções tardias, quando a semente está atingindo a maturidade, podem permanecer superficiais, a menos que o ambiente (umidade e temperatura) seja favorável ao patógeno por um longo período (SINGH & MATHUR; 2004).

Os testes fitossanitários utilizados para se determinar a sanidade de sementes são baseados em métodos de incubação ou microscopia (MUNKVOLD, 2009), que às vezes também necessitam de testes de patogenicidade. Atualmente para se determinar a incidência de *Fop* em sementes de feijão têm-se utilizado testes de rotina, como o “blotter test” ou teste do papel de filtro (BRASIL, 2009). A dificuldade de realização deste método consiste na necessidade de pessoas especializadas, trabalho intensivo, demora na obtenção dos resultados e na simples determinação da presença do patógeno, sem quantificá-lo. A utilização deste teste para a determinação e quantificação de *Fop* é limitada, devido a outras espécies relacionadas que são morfológicamente semelhantes (ALVES-SANTOS et al. , 2002a) o que pode ser solucionado através da utilização de métodos baseados em testes de PCR (MUNKVOLD, 2009).

Os testes baseados em PCR tem sido aplicados a diversos patógenos associados às sementes (MUNKVOLD, 2009), no entanto a maioria dos estudos que utilizaram a técnica de PCR foram apenas para a detecção específica do patógeno nas sementes e não para a quantificar o nível de contaminação (CHIOCCHETTI et al., 2001; GRACIA-GARZA et al., 1999; KULIK, 2008; MBOFUNG; PRYOR, 2010). Testes para se quantificar o DNA do patógeno presente em sementes é desejável para medir o nível de infecção do lote. A técnica de PCR convencional possibilita ter uma ideia da quantidade de DNA do patógeno presente na semente, no entanto não é exata, se tornando uma quantificação não confiável, o que pode ser obtido através da utilização de técnicas de PCR em tempo real (GLYNN & EDWARDS, 2010).

PCR em tempo real tem um grande potencial para substituir ou complementar os testes utilizados atualmente, devido à velocidade para a realização, especificidade, sensibilidade e quantificação do DNA alvo (GANCHON; MINGAM; CHARRIER, 2004; MUNKVOLD, 2009). Outro motivo que torna a técnica viável seria o grande número de amostras que podem ser processadas dentro de um período curto de tempo, sendo convenientemente aplicado para análise de sementes comerciais e de certificação. (MBOFUNG & PRYOR, 2010).

Sousa et. al (2015) trabalhando com detecção molecular baseada em PCR em tempo real propôs um protocolo para detecção específica de isolados de *Fop*, onde a utilização de TaqMan qPCR se mostrou uma técnica rápida, eficaz, sensível e confiável de detecção e quantificação de *Fop*. A autora verificou ainda que *Fop* está associado às sementes de feijão externamente, no tegumento, com penetração das hifas para o interior das mesmas, atingindo o embrião, porém sem quantificar a presença do patógeno em cada um dos tecidos.

## 2.5 Métodos de inoculação de fungos em sementes

Devido às dificuldades em se obter sementes naturalmente infectadas com diferentes níveis de infecção por patógenos, a inoculação artificial de sementes torna-se necessária para o desenvolvimento de trabalhos de pesquisa. Este tipo de inoculação precisa garantir a reprodução da sintomatologia típica da doença e ainda possibilitar a sua aplicação em estudos de detecção, patogenicidade, transmissibilidade, melhoramento genético do hospedeiro, controle, dentre outros (TANAKA; MENTEN, 1991; TANAKA; MENTEN; MARIANNO, 1989).

Os métodos mais simples de inoculação de sementes consistem na imersão delas numa suspensão de esporos e/ou hifas ou em apenas revesti-las com esporos de patógenos (AGARWAL; SINCLAIR, 1987; TANAKA; MENTEN, 1991), e, ainda, por meio de contato das sementes com a colônia fúngica desenvolvida em meios de cultura convencionais (ALBUQUERQUE, 2000; SANTOS, 1995). Por estes métodos, os fungos ficam, em sua maioria, aderidos ao tegumento das sementes, não garantindo o processo de infecção e sim contaminação (MACHADO et al., 2001; TANAKA; MENTEN, 1991).

Em estudo específico, Tanaka e Menten (1991) compararam três métodos de inoculação de sementes de algodoeiro com *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* com vistas à obtenção de sementes infectadas. Os métodos utilizados constaram do contato das sementes com a colônia dos fungos durante 24 horas; imersão das sementes em suspensão de conídios durante 30 minutos; e imersão das sementes em suspensão de conídios durante 2 horas. Dentre estes, o primeiro método foi considerado o mais eficaz na obtenção de sementes infectadas, mostrando a importância do tempo de exposição da semente ao patógeno, permitindo a colonização dos tecidos internos.

No entanto, a inoculação de sementes por contato direto com os fungos em meio agarizado (BDA), pode não produzir níveis de infecção satisfatórios para determinadas finalidades, pelo fato de haver limite do tempo de exposição das sementes ao fungo, visto que as sementes podem iniciar o processo de germinação em curto período de tempo (MACHADO et al., 2001). A técnica de condicionamento osmótico já conhecida em tecnologia de sementes visando a potencialização do processo de germinação de algumas espécies tem demonstrado resultados satisfatórios também na patologia de sementes como parte de uma metodologia de inoculação de sementes com alguns fungos e bactérias de interesse no Brasil (MACHADO; LANGERAK, 2002).

Por meio desta técnica, a inoculação de sementes mostra-se eficaz e bastante promissora para todos os patossistemas estudados (CARVALHO, 1999; COSTA et al., 2003; MACHADO, 2002; MACHADO et al., 2001, 2004; MACHADO; MACHADO, 2002). A metodologia consiste na exposição das sementes ao fungo desenvolvido em meio de cultura contendo um restritor hídrico, por diferentes períodos de tempo, permitindo a obtenção de sementes com diferentes potenciais de inóculo (COSTA et al., 2002; PRADO et al., 2002; SOUSA et al., 2002).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Patologia de Sementes (LAPS) do Departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

#### 3.1 Obtenção, multiplicação e checagem da patogenicidade do isolado de *F. oxysporum* f. sp *phaseoli* (*Fop*)

O isolado monospórico de *F. oxysporum* f. sp *phaseoli* (*Fop* 07) foi obtido a partir da coleção de Micologia do Departamento de Fitopatologia (CML) da Universidade Federal de Lavras-MG (UFLA).

O isolado foi cultivado em meio de batata-dextrose-ágar (BDA) a uma temperatura de 25°C. De acordo com Alves-Santos et al. (2002a) para o teste de patogenicidade foram semeadas 100 sementes em bandejas plásticas contendo areia e transferidas para uma câmara de crescimento vegetal a 25°C ±2 por 15 dias. No 15º dia as plantas foram retiradas da areia, as raízes foram lavadas em água corrente e cortadas deixando-as apenas com dois centímetros, em seguida foram mantidas imersas por cinco minutos em suspensão de conídios (macroconídios, microconídios e clamidósporos) de 10<sup>6</sup> conídios/ml de água, sendo transplantadas logo após a inoculação para copos descartáveis contendo substrato autoclavado composto por solo, areia e composto orgânico na proporção de 1:1:1. Foi realizado o mesmo procedimento para as testemunhas, que permaneceram imersas em água. As plantas inoculadas foram mantidas em câmara de crescimento a 25°C ±2, com fotoperíodo de 12 h, umidade relativa em torno de 60 a 80% e irrigadas de acordo com a necessidade. Após esse processo foram realizadas avaliações para acompanhar o desenvolvimento da

doença e utilizada a escala adaptada de CIAT (PASTOR-CORRALES; ABAWI, 1987) para determinar a severidade.

Tabela 1 Escala adaptada de CIAT (PASTOR-CORRALES; ABAWI, 1987).

Nota	Descrição
0	Nenhum sintoma da doença; completamente sadio;
2	10% da área foliar mostrando sintomas da doença;
4	Mais de 25% da superfície foliar exibindo sintomas da doença assim como enfezamento da planta inteira;
6	Sintoma em mais de 50% das folhas e severo enfezamento;
8	Planta morta.

### 3.2 Sementes de feijão utilizadas

Para este estudo foram utilizadas sementes da cultivar BRS Estilo, considerada suscetível à murcha de fusarium. Conforme análises realizadas para se conhecer o perfil do lote de sementes foi verificada uma germinação inicial de 96% e não foi constatada a presença de *Fop*. Os testes foram realizados conforme descritos nas Regras para Análise de Sementes - RAS (BRASIL, 2009).

### 3.3 Procedimentos de inoculação do fungo nas sementes

Três técnicas de inoculação foram utilizadas nesse trabalho: A) técnica de embebição das sementes em suspensão de conídios por cinco períodos de tempo; B) técnica de contato das sementes com o patógeno em meio de cultura

sólido sem restritor hídrico por cinco períodos de tempo; C) técnica de condicionamento osmótico, onde as sementes foram mantidas em contato com o patógeno na presença de um restritor hídrico em meio de cultura sólido por seis períodos de tempo. Para cada tratamento foi utilizada uma testemunha.

As sementes inicialmente foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% durante um minuto e em seguida lavadas rapidamente em água esterilizada e secas ao ar, em papel “*germitest*”, durante 48 horas.

Após cada período de tempo e para cada uma das técnicas utilizadas, as sementes foram retiradas e secas em temperatura ambiente por 48h. Em seguida, as sementes foram colocadas em sacos de papel e armazenadas, em câmara fria e seca, onde permaneceram 15 dias até a realização das análises.

### **3.3.1 Inoculação pela embebição das sementes**

As sementes foram imersas em suspensão de conídios de *Fop* com três concentrações ( $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  conídios/mL) e mantidas, em separado, nessas condições por cinco períodos de tempo, 0 minutos (Potencial 0 – P0), 20 minutos (Potencial 1 – P1), 30 minutos (Potencial 2 – P2), 40 minutos (Potencial 3 – P3) e 60 minutos (Potencial 4 – P4) sob agitação constante em um shaker mecânico horizontal com temperatura de 25°C e rotação de 150 rpm segundo a metodologia descrita por Sousa (2006). Foram colocadas 100 sementes em cada erlenmeyer contendo 100 mL da suspensão. As sementes testemunhas ficaram sob agitação constante por 0, 20, 30 40 e 60 minutos apenas em água destilada, sem a presença do patógeno.

### **3.3.2 Inoculação pelo contato das sementes com a colônia do patógeno em meio de cultura sólido**

Seguindo a metodologia descrita por Costa et al. (2003), o inóculo de *Fop* foi cultivado em meio BDA a 25 °C  $\pm$ 2 para a obtenção de colônias que posteriormente foram utilizadas para a produção de uma suspensão de conídios, cuja concentração foi ajustada em 10<sup>6</sup> conídios/mL. Desta suspensão, alíquotas de 1mL foram espalhados sobre meio sólido BDA em placas de Petri de 15 cm de diâmetro. As placas foram mantidas em temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas/dia. Após a incubação do fungo por cinco dias, 150 sementes foram colocadas aproximadamente em cada placa, com incubação a 25°C. As sementes permaneceram sobre a colônia fúngica por diferentes períodos de tempo: 0 horas (Potencial 0 – P0), 18 horas (Potencial 1 – P1), 24 horas (Potencial 2 – P2), 36 horas (Potencial 3 – P3) e 48 horas (Potencial 4 – P4). Nas testemunhas as sementes permaneceram em contato com o meio BDA sem a presença do patógeno por 0, 18, 24, 36 e 48h.

### **3.3.3 Inoculação pelo contato das sementes com a colônia do patógeno em substrato sólido modificado com restritor hídrico**

Para a inibição da germinação das sementes foi utilizado o restritor hídrico manitol a um potencial osmótico de -1,0 MPa, conforme utilizado anteriormente por Costa et al.(2003).

De forma semelhante ao que foi descrito para a técnica anterior (item 3.3.2) o inóculo foi cultivado em meio BDA mais manitol para a formação de colônias de *Fop*. As sementes permaneceram sobre as colônias fúngicas por diferentes períodos de tempo: 0 horas (Potencial 0 – P0), 24 horas (Potencial 1 –

P1), 48 horas (Potencial 2 – P2), 72 horas (Potencial 3 – P3), 96 horas (Potencial 4 – P4) e 108 horas (Potencial 5 – P5).

O meio agarizado foi preparado pela adição do manitol ao BDA e o cálculo da concentração do soluto foi realizado com base no *software* SPPM (MICHEL; RADCLIFFE, 1995), tendo sido utilizados 84,7g de manitol e 39g de BDA por litro de água. Nas testemunhas as sementes ficaram em contato com o meio contendo manitol sem a presença do patógeno por 0, 24, 48, 72, 96 e 108h.

### **3.4 Avaliações**

Após a inoculação de *Fop* pelas três técnicas descritas, as sementes de feijão foram analisadas pelos testes:

#### **3.4.1 Germinação**

Este teste foi conduzido com base nas recomendações de Brasil (2009), com algumas modificações. Foram utilizadas oito repetições de 25 sementes sobre substrato de papel-toalha (tipo “*germites*”) umedecido com água destilada, 2,5 vezes o peso do papel seco. Os rolos de papel foram colocados em germinador regulado à temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , por sete dias. Realizou-se a contagem de plântulas normais, anormais e mortas.

#### **3.4.2 Condutividade Elétrica**

Para este teste, tendo a finalidade de verificar a integridade da membrana das sementes, foram utilizadas 200 sementes por tratamento, divididas

em quatro repetições de 50. As sementes foram colocadas dentro de copos plásticos contendo 70 mL de água deionizada, sendo mantidas por 16h em câmara de germinação, no escuro, a 25°C. Após esse período a condutividade elétrica da solução foi medida por meio de leituras em um condutímetro DIGIMED, modelo DM-21 previamente calibrado em solução de KCl seguindo a metodologia descrita em Dutra, Medeiros Filho e Teófilo (2006).

### **3.4.3 Índice de velocidade de emergência (IVE), estande inicial e final**

Quatro repetições de 25 sementes foram utilizadas para a realização deste teste. As sementes foram semeadas individualmente em copos descartáveis, contendo substrato autoclavado composto por areia:solo:composto orgânico, na proporção de 1:1:1. Após a semeadura, os copos foram acondicionados em bandejas plásticas, que foram mantidas em câmara de crescimento vegetal, em blocos aleatórios, à temperatura de 25°C  $\pm$ 2 e fotoperíodo de 12 h, durante 28 dias.

O estande inicial foi avaliado no quarto dia após o plantio e o estande final ao 15º dia após o plantio.

O índice de velocidade de emergência foi determinado pela contagem diária de plântulas que apresentaram os cotilédones expostos acima do solo, até o alcance da estabilização do estande e posteriormente calculada pela fórmula proposta por Maguire (1962).

$$\text{IVE} = \sum_{i=1}^n N_i/D_i, \text{ onde:}$$

IVE = índice de velocidade de emergência;

$N_i$  = número de plantas germinadas na 1ª contagem, 2ª contagem, ...enésima contagem, respectivamente;

$D_i$  = número de dias após semeadura na 1ª contagem, 2ª contagem, ...enésima contagem, respectivamente;

#### 3.4.4 Índice de doença

A severidade da doença foi avaliada no 28º dia após o plantio por meio do índice de doença descrito por McKinney (1923). A escala diagramática de CIAT (PASTOR-CORRALES; ABAWI, 1987) foi utilizada para o cálculo do índice de doença com algumas modificações, notas variando de 0 a 8, onde 0 corresponde as plantas sem sintomas e 8 plantas com sintomas severos ou morte.

$$\text{ID (\%)} = \sum [(f n) / (NX)]100, \text{ onde:}$$

ID = índice de doença

f = número de plantas com determinada nota

n = nota observada

N = número total de plantas avaliadas

X = nota máxima da escala

### 3.4.5 Verificação da presença de inóculo de *Fop* nos tecidos das sementes inoculadas

As sementes inoculadas foram manualmente dissecadas em 3 partes: tegumento, cotilédone e eixo embrionário. Para esta operação 10 sementes de cada tratamento foram mantidas em câmara úmida por 18h, sendo colocadas em seguida sobre um papel toalha e com a ajuda de uma lâmina desinfestada o tegumento foi cortado e retirado, tendo sido cada semente dividida ao meio possibilitando a separação do cotilédone e do eixo embrionário.

Após a dissecação foi realizado o plaqueamento dos tecidos em placas de Petri de 15 cm, contendo 40 ml de meio BDA. Ao segundo e sétimo dias após o plaqueamento, os tecidos foram examinados quanto a presença do inóculo de *Fop*.

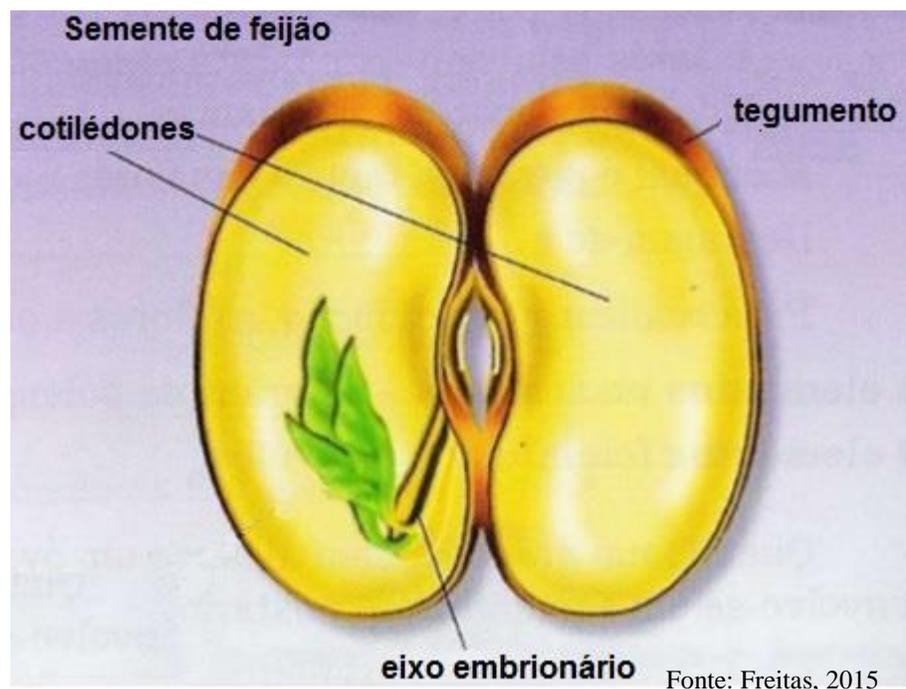


Figura 1 Partes de semente de feijão que foram dissecadas no presente trabalho.

### **3.5 Delineamento experimental**

Os testes de germinação e condutividade elétrica foram conduzidos sob delineamento inteiramente casualizado. Já os demais testes foram conduzidos em delineamento em blocos inteiramente casualizados.

Os dados foram submetidos á análise de variância, e quando significativos, procedeu-se com o ajuste de modelos de regressão linear. Os modelos foram selecionados com base no maior coeficiente de determinação e menor quadrado médio dos desvios. Para os fatores qualitativos, os tratamentos foram comparados por meio do teste de Tukey.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Teste de Patogenicidade

O isolado de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* utilizado mostrou-se altamente virulento ao feijoeiro.



Figura 2 Plantas de feijão da cultivar BRS Estilo inoculadas com *Fop* sete dias após a inoculação.

### 4.2 Desempenho das sementes inoculadas pelo método de embebição

Pela análise de variância dos dados verificou-se que houve interação significativa ao nível de 5% para as variáveis concentração x período de embebição apenas no teste de germinação. Para os testes de condutividade elétrica e estande inicial houve efeito separado de concentração e de período de

embebição, para o teste de índice de velocidade de emergência (IVE) houve efeito significativo apenas da concentração de inóculo e para os testes de estande final e índice de doença (ID) houve efeito apenas do período de embebição.

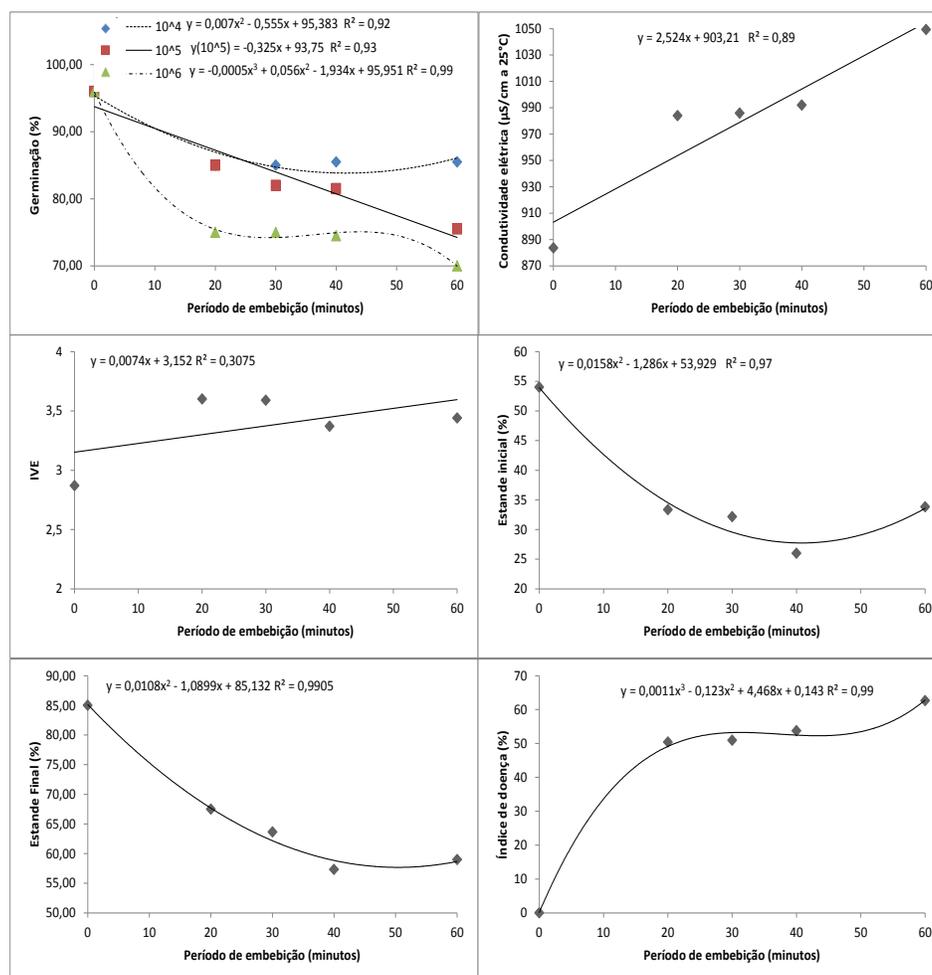
Por meio da análise de regressão é possível verificar que no P4 (60 minutos de embebição) houve uma redução no percentual de germinação de 26% na concentração de  $10^6$  conídios/mL, de 20,5% na concentração de  $10^5$  conídios/mL e de 10,5% na concentração de  $10^4$  conídios/mL.

Em relação ao IVE não houve diferença significativa para os períodos de embebição nas concentrações utilizadas; a menor média encontrada (3,11) foi para a concentração de  $10^4$  conídios/mL e a maior para a concentração de  $10^6$  conídios/mL (3,74) (Tabela 20).

No potencial de inóculo de *Fop* P3 (40 minutos de embebição) foi verificada a menor média de estande inicial e final, com os valores de 26% e 57,33%, respectivamente. No potencial de inóculo mais elevado pelo método de embebição o valor médio encontrado foi 33,83% para estande inicial e de 59% para estande final. Para o estande inicial houve diferença significativa a nível de 5% também para as concentrações, a maior média encontrada foi para a concentração  $10^6$  conídios/mL, com valores de 41,70%, no entanto a maior média de estande final foi observada na concentração de  $10^4$  conídios/mL, com valor médio de 68,20% (Tabelas 21 e 22).

Por meio da análise de regressão para o teste de condutividade elétrica a maior média encontrada ocorreu no potencial P4 (embebição por 60 minutos), com um valor de 1049,259  $\mu\text{S}/\text{cm}$  a  $25^\circ\text{C}$  e a menor média observada foi nas testemunhas, com 883,675  $\mu\text{S}/\text{cm}$  a  $25^\circ\text{C}$ . Em relação às concentrações, a maior média de condutividade elétrica foi observada na concentração de  $10^6$  conídios/mL com valor de 1024,49  $\mu\text{S}/\text{cm}$  a  $25^\circ\text{C}$ . No maior potencial de

inóculo de *Fop* pelo método de embebição foi observada ainda a maior média para o índice de doença, em torno de 62,66% (Figura 3).



**Figura 3** Porcentagem de germinação, condutividade elétrica, índice de velocidade de emergência (IVE), estande inicial, estande final e índice de doença das sementes/plantas de feijão (BRS Estilo) inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* pelo método de embebição.

### **4.3 Desempenho das sementes inoculadas pelo método de contato com o patógeno sem a presença de restritor hídrico**

Por meio da análise de variância dos dados referentes às avaliações dos testes de germinação, estande inicial, estande final, condutividade elétrica e índice de doença (Figura 4) foi possível observar diferenças significativas ao nível de 5% entre os potenciais de inóculo avaliados neste estudo. Para o IVE não houve diferença significativa ao nível de 5% de significância.

No potencial de inóculo P4 (48 horas de exposição), verificou-se os efeitos mais acentuados de *Fop* na germinação, estande inicial, estande final e condutividade elétrica (Figura 4). A redução no percentual de germinação foi da ordem de 35,5%. Para as demais variáveis avaliadas pelo teste de emergência em bandejas, as médias foram de 16% para estande inicial, 42% para estande final e de 1538,75 de condutividade elétrica. No potencial de inóculo P3 (36 horas de exposição) foi o que apresentou a maior média do índice de doença, 84,75% (Figura 4).

No potencial mais baixo (P1 - 18 horas de exposição) ocorreu a menor redução do percentual de germinação (13,5%) com a menor média no índice de doença (49,25%) (Figura 4). Nesse mesmo período foi possível observar ainda, as maiores médias no estande inicial (46%) e final (82%) e a menor média na condutividade elétrica (1101,87) (Figura 6).

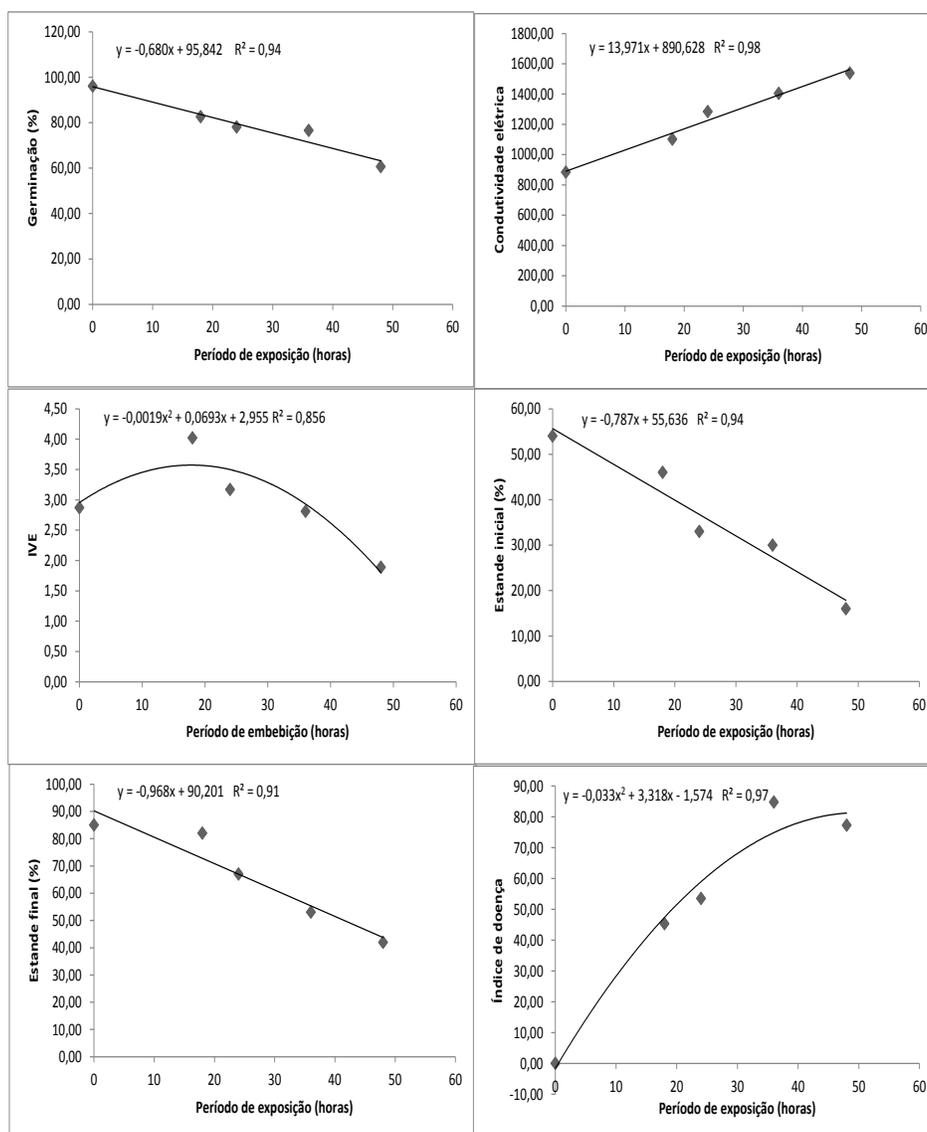


Figura 4 Porcentagem de germinação, condutividade elétrica, índice de velocidade de emergência (IVE), estande inicial, estande final e índice de doença das sementes/plantas de feijão (BRS Estilo) inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* pelo método de exposição das sementes ao patógeno sem a presença de restritor hídrico.

#### **4.4 Desempenho das sementes inoculadas pelo método de contato com o patógeno na presença de restritor hídrico**

Pelos resultados apresentados na Figura 7, com base na análise de regressão ao nível de 5% de significância, observa-se que houve diferenças estatísticas significativas entre os potenciais de inóculo comparados, considerando-se as variáveis: germinação, IVE, estande inicial, estande final, condutividade elétrica e índice de doença.

No maior potencial de inóculo (P5 - 108 h de exposição), houve a maior redução do percentual médio de germinação (94%), a menor média de IVE (0,77) e estande final (17%). No estande inicial a menor média verificada foi no potencial P4 (96h de exposição), com média de 3%, seguido pelo potencial P5 com 5%. Os maiores valores médios de índice de doença foram também observadas nos potenciais de inóculo mais elevados com valores de 96,75% para P4 e de 96,5% para P5 (Figura 5).

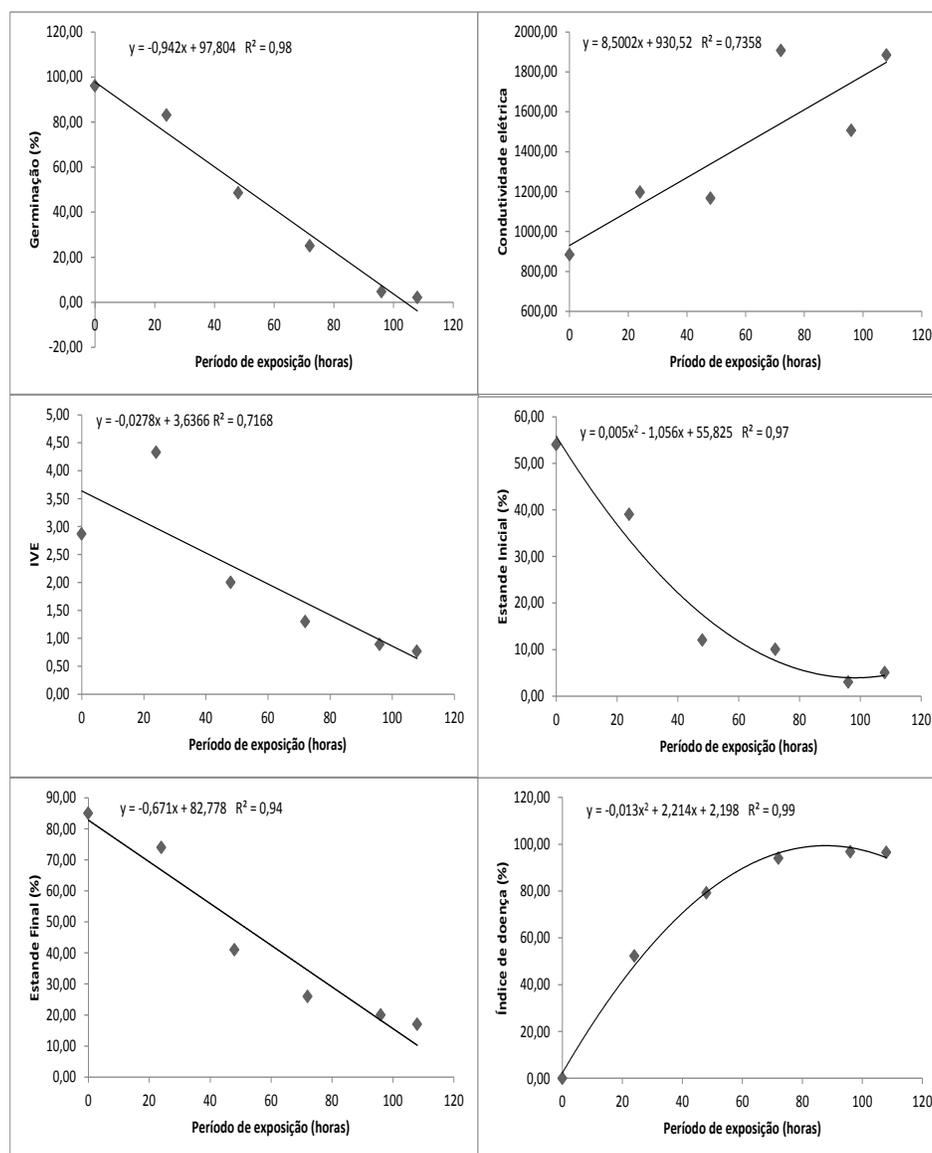


Figura 5 Porcentagem de germinação, condutividade elétrica, índice de velocidade de emergência (IVE), estande inicial, estande final e índice de doença das sementes/plantas de feijão (BRS Estilo) inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* pelo método de exposição das sementes ao patógeno na presença de restritor hídrico.

#### 4.5 Localização do inóculo de *Fop* nos tecidos das sementes inoculadas

Independente dos métodos de inoculação utilizados, verificou-se a presença de *Fop* no tegumento de todas as sementes testadas.

Nos potenciais de inóculo mais elevados correspondendo aos tempos de exposição das sementes ao patógeno no método de contato em meio de cultura sólido acrescido de restritor hídrico, P3 (72 horas), P4 (96 horas) e P5 (108 horas), houve presença de *Fop* em todos os tecidos das sementes plaqueadas. No potencial P2 (48h de exposição) houve 90% de presença de *Fop* nos cotilédones e 60% nos tecidos embrionários; no potencial P1 (24h de exposição) não se detectou a presença do patógeno nos cotilédones e eixos embrionários.

Pelo método de contato das sementes com o patógeno em meio de cultura sólido sem a presença de restritor hídrico (manitol), no potencial P4 (48h de exposição) o fungo foi detectado em 100% de cotilédones e 80% dos eixos embrionários, no potencial P3 (36h de exposição) houve presença do patógeno em 80% dos cotilédones e em 40 % dos eixos embrionários, já no potencial P1 (18h de exposição) o patógeno foi detectado em 40% dos cotilédones e 20% dos eixos embrionários.

Na concentração de  $10^6$  conídios/ml de *Fop* nos potenciais P3 e P4 (40 e 60 minutos de embebição) observou-se a presença do patógeno em 10% de cotilédones; no P1 (20 minutos de embebição) a presença do patógeno não foi verificada nos cotilédones e eixos embrionários. Na concentração de  $10^5$  conídios/ml, o patógeno também foi encontrado apenas em 10% de cotilédones nos potenciais P3 e P4 (40 e 60 minutos de embebição). Na concentração de  $10^4$  conídios/ml não foi detectado inóculo de *Fop* nos cotilédones e eixos embrionários em nenhum potencial de inóculo.

## 5 DISCUSSÃO

Uma das grandes dificuldades em trabalhos de pesquisa em Patologia de Sementes é a obtenção de sementes portadoras de patógenos com incidência e potencial de inóculo satisfatórios para a realização de alguns tipos de estudos, como ocorre no campo de detecção desses patógenos em amostras de sementes, avaliação da eficácia do tratamento sanitário de sementes e outros estudos de interesse epidemiológico. A obtenção de sementes com contaminação ou infecção natural depende de vários fatores, como a sazonalidade e do próprio nível de incidência e intensidade de inóculo nos lotes analisados. Para alguns patógenos o nível de associação com sementes de espécies suscetíveis é baixo e em geral pouco frequente.

Os resultados deste trabalho deixam claro que sementes de feijão portadoras de *Fusarium oxysporum* f.sp *phaseoli* podem ser obtidas por métodos de inoculação com diferentes potenciais de inóculo, lembrando-se que a base destes métodos é o tempo de contato entre sementes e inóculo do patógeno sob condições controladas. Tanto pelo contato via embebição como pelo contato em substrato sólido foi possível contaminar e infectar sementes de feijão, havendo no entanto diferenças entre os métodos no que diz respeito ao grau de interação entre o referido patógeno e as sementes de feijão. Apesar do conhecimento que já se dispõe sobre a eficácia destes métodos de inoculação, nenhuma informação pontual foi encontrada sobre comparação de métodos para um mesmo patossistema. No presente caso considera-se de suma importância estes resultados por serem provenientes de uma comparação de métodos sob as mesmas condições e realizada ao mesmo tempo.

É importante salientar que uma desvantagem do método de embebição é o risco que se corre em termos de eventual separação do tegumento dos demais tecidos das sementes durante e após o processo de embebição das sementes.

Pelo método de contato de sementes e patógenos em substrato agarizado sólido sem restrição hídrica corre-se o risco de haver protrusão radicular das sementes a partir de 48 horas de contato entre sementes e a colônia fúngica. Este fato constitui uma limitação, em casos onde se busca a obtenção de sementes com potenciais de inóculo mais elevados. Por sua vez a adaptação deste método pela adição de um restritor hídrico, no caso manitol, torna-se possível a obtenção de sementes infectadas pelo patógeno com níveis diferenciados de potencial de inóculo. Por este método já se demonstrou que as sementes podem ser secas após a inoculação e armazenadas por períodos relativamente longos, conforme estudo realizado com sementes de algodão infectadas por *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (CELANO, 2004).

De uma forma comparativa dos métodos estudados, percebe-se que para todas as variáveis utilizadas houve um efeito maior do patógeno presente nas sementes inoculadas por meio do contato das sementes com a colônia fúngica em substrato com restritor hídrico.

Com base nos resultados dos três métodos de inoculação comparados neste estudo percebe-se que houve um efeito crescente, mas variável, do tempo de contato das sementes com o inóculo de *Fop*. As sementes embebidas por 30 minutos (P2) na concentração de  $10^5$  conídios/ml proporcionaram médias do percentual de germinação próximas as sementes do potencial 1 (18h de exposição) sem a presença de um restritor hídrico (manitol) e no potencial P1 (24h de exposição) na presença de um restritor hídrico, com valores de germinação em cerca 82%, 82,5% e 83%, respectivamente. No potencial de inóculo mais elevado P6 (108 horas) foi observado a maior redução de germinação, de 96% para uma média de 2%, valor esse, que não foi encontrado em nenhum outro potencial de inóculo, o que indica o resultado da influência da presença do patógeno nas sementes.

A análise dos dados do teste de IVE apontou que as médias para as sementes embebidas nas concentrações de  $10^4$  e  $10^5$  conídios/ml, com valores de 3,11 e 3,28 foram próximas aos valores encontrados no potencial P2 (24 horas) pelo método de contato sem restrição hídrica, que foi de 3,17. A pouca diferença encontrada nas médias para IVE pode ser explicada com base nos conhecimentos de tecnologia de sementes onde se utiliza a restrição hídrica ou condicionamento osmótico para potencializar o processo de germinação de sementes de um lote. Neste caso o contato inicial das sementes com a umidade controlada ou não, pode ter sido a causa do aumento do percentual de germinação inicial das sementes mesmo na presença de Fop. Vale lembrar que as sementes utilizadas apresentavam um perfil de qualidade considerado elevado para os padrões de programas de certificação. A análise desta variável por si só pode não retratar os efeitos reais da interação do patógeno com as sementes.

Em relação ao estande inicial foi possível verificar que as médias encontradas para as plantas provenientes de sementes embebidas na concentração de  $10^4$  conídios/ml (Figura 3) estão muito próximas das médias encontradas em plantas provenientes do potencial P2 (24 horas) sem a presença de restritor hídrico, estas médias foram da ordem de 34% e 33%. No estande final os valores médios observados nas plantas provenientes de sementes inoculadas nas concentrações de  $10^4$  e  $10^5$  conídios/ml foram próximas a média encontrada nas plantas provenientes de sementes inoculadas pelo método de contato sem restrição hídrica no potencial P2 (24 horas) com valores em torno de 67%. No potencial P4 sem restrição hídrica e no potencial P2 com restrição hídrica (48 horas de exposição) as médias observadas foram próximas, com valores de 42% para o método sem restrição hídrica e 41% para o método com restrição hídrica. Na inoculação das sementes com restrição hídrica os menores valores médios de estande final foram observados nos maiores potenciais de

inóculo, com valores de 20% para P4 (96 horas) e de 17% para P5 (108 horas). Valores com tendência similar aos encontrados neste trabalho foram também verificados em outros patossistemas, como *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em plantas de algodão por Machado (2004) e Sousa (2008), entre outros.

Os resultados referentes a condutividade elétrica revelam que quanto maior o período de contato do patógeno com as sementes menor o vigor das mesmas, uma vez que o teste de condutividade elétrica baseia-se no princípio de que devido a perda da integridade dos sistemas celulares (VIEIRA; KRZYZANOWSKI, 1999) ocorre lixiviação dos constituintes das células. A presença do patógeno provocou aumento da lixiviação de solutos e isto é considerado um dos eventos iniciais no processo de deterioração das sementes.

Por sua vez as maiores médias do índice de doença foram observadas nos potenciais de inóculo mais elevados pelo método de restrição hídrica, 96,5% para o potencial P5 (108 horas) e 96,75% para o potencial P4 (96 horas), o que evidencia o maior efeito do patógeno no desempenho das sementes em relação aos outros métodos.

Desta forma fica evidente que a inoculação pelo método de contato semente-fungo, na presença de manitol é um procedimento eficaz e viável para a obtenção de sementes de feijão com diferentes níveis de potencial de inóculo, como já verificado por Costa et al. (2002), Prado et al. (2002) e Sousa et al. (2002).

Por esses resultados fica claro também a alta correlação entre os potenciais de inóculo de todos os métodos testados e as variáveis utilizadas para avaliação dos efeitos neste tipo de interação. Os efeitos foram progressivamente decrescente para as variáveis indicadoras de qualidade fisiológica de sementes e crescentes para a variável utilizada para verificar o efeito do patógeno no desempenho das sementes.

Em relação a localização do inóculo de *Fop* nas sementes inoculadas neste estudo, foi possível verificar que em potenciais de inóculo mais baixos ocorre apenas a contaminação das sementes, estando o fungo presente apenas nos tecidos de proteção (tegumento) e somente nos potenciais de inoculo mais elevados, com restrição hídrica, o patógeno foi detectado nos tecidos do eixo embrionário o que indica o risco de se utilizar sementes portadoras deste patógeno nesta condição por tratar-se de um organismo de solo.

## 6 CONCLUSÕES

- Por meio da técnica de inoculação de sementes via contato de sementes e patógeno em substrato agarizado sólido com restrição hídrica é possível obter sementes de feijão infectadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* com diferentes níveis de potencial de inóculo deste patógeno.
  
- Por meio da técnica de embebição das sementes de feijão em suspensão de inóculo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* é possível obter-se sementes contaminadas e com baixos índices de infecção.
  
- O método de inoculação baseado em contato das sementes com colônia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, sem restrição hídrica, possibilita a obtenção de sementes infectadas por este patógeno, porém em níveis de potencial de inóculo mais baixos do que o método com restrição hídrica.
  
- Por meio da inoculação artificial das sementes em meio sólido agarizado, *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* pode colonizar todos os tecidos das sementes em graus variáveis em função do tempo de exposição das sementes ao patógeno.

## REFERÊNCIAS

AGARWAL, V. K.; SINCLAIR, J. B. **Principles of seed pathology**. Boca Raton: CRC, 1987. v. 1, 175 p.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5<sup>th</sup> ed. Burlington: Elsevier Academic, 2005. 922 p.

AIDAR, H. **Sistemas de produção: cultivo do feijoeiro comum**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/Fonteshtml/Feijao/CultivodoFeijoeiro/index.htm>>. Acesso em: 3 fev. 2014.

ALBUQUERQUE, M. C. F. **Desempenho germinativo e testes de vigor para sementes de girassol, milho e soja, semeadas sob condições de estresse ambiental**. 2000. 161 p. Tese (Doutorado em Produção e Tecnologia de Sementes) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

ALVES-SANTOS, F. M. et al. DNA-based procedure for in plant detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Phytopathology**, Berlin, v. 92, n. 3, p. 237-244, Mar. 2002a.

ALVES-SANTOS, F. M. et al. Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. **Plant Pathology**, Malden, v. 51, n. 5, p. 605-611, Oct. 2002b.

ANUÁRIO da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Agroinformativos, 2015. 480 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 395 p.

CAMPOS-VEGA, R. et al. Common beans and their non-digestible fraction: câncer inhibitory activity: an overview. **Foods**, Basel, v. 2, n. 3, p. 374-392, Sept. 2013.

CARVALHO, J. C. B. de. **Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1999. 98 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

CELANO, F. A. de O. **Desempenho de sementes de algodão durante o armazenamento, após inoculação com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* pela técnica de restrição hídrica**. 2004. 83 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

CHIOCCHETTI, A. et al. PCR detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Basilica* on Basil. **Plant Disease**, Quebec, v. 85, p. 607-611, June 2001.

COSTA, M. L. N. et al. Efeito de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* no desempenho de sementes de feijoeiro infectadas artificialmente. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas. **Anais...** Sete Lagoas: EMBRAPA, 2002. p. 42.

COSTA, M. L. N. et al. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1023-1030, set./out. 2003.

DUTRA, A. S.; MEDEIROS FILHO, S.; TEÓFILO, E. M. Condutividade elétrica em sementes de feijão caupi. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 37, n. 2, p. 166-170, 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Statistics division**. Rome, 2013. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>>. Acesso em: 1 fev. 2015.

FREITAS, L. **Angiospermas**: presença de flor, semente e fruto. Disponível em: <<http://pt.slideshare.net/infoeducp2/reproduo-nas-angiospermas-1>>. Acesso em: 14 ago. 2015.

GANCHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, Paris, v. 55, p. 1445-1454, July 2004.

GLYNN, N. C.; EDWARDS, S. G. Evaluation of PCR assays for quantifying seed-borne infection by *Fusarium* and *Microdochium* edling blight pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 108, n. 1, p. 81-87, Jan. 2010.

GRACIA-GARZA, J. A. et al. Potential for dispersal of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Erythroxyli* by infected seed. **Plant Disease**, Quebec, v. 83, p. 451-455, May 1999.

JENSEN, C. E.; KURLE, J. E.; PERCICH, J. A. Integrated management of edaphic and biotic factors limiting yield of irrigated soybean and dry bean in Minnesota. **Field Crops Research**, Philadelphia, v. 86, n. 2/3, p. 211-224, Mar. 2004.

KULIK, T. Development of a duplex PCR assay for the simultaneous detection of *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* from wheat. **Journal of Plant Pathology**, Olsztyn, v. 90, n. 3, p. 441-447, Mar. 2008.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium laboratory manual**. Ames: Blackwell, 2006. 388 p.

MACHADO, A. Q. **Uso da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes de algodoeiro**. 2002. 55 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

MACHADO, A. Q.; MACHADO, J. C. Estudo da relação entre o potencial de inóculo de *Fusarium verticillioides* (syn. *F. moniliforme*) e o desempenho de

sementes de milho por meio da técnica de restrição hídrica. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete lagoas. **Anais...** Sete Lagoas: EMBRAPA, 2002. p. 453.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes:** fundamentos e aplicações. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE, 1988. 106 p.

MACHADO, J. C. et al. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 95-101, 2001.

MACHADO, J. C. et al. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 4, p. 62-67, 2004.

MACHADO, J. C. et al. Uso da técnica de restrição hídrica ou “Condicionamento Osmótico” em patologia de sementes. **RAPP**, Rio de Janeiro, v. 20, p. 37-63, 2012.

MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J. General incubation methods for routine seed health analysis. In: MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J.; JACCOUD-FILHO, D. S. (Ed.). **Seed-borne fungi:** a contribution to routine seed health analysis. Bassersdorf: ISTA, 2002. p. 48-80.

MACHADO, J. C., POZZA, E. A. Razões e procedimentos para o estabelecimento de padrões de tolerância a patógenos em sementes. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Sementes:** qualidade fitossanitária. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 375-398.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, Madison, v. 2, p. 176-177, 1962.

MBOFUNG, G. C. Y.; PRYOR, B. M. A PCR-based assay for detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lactucae* in lettuce seed. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 7, p. 860-866, July 2010.

MCKINNEY, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal Agricultural Research**, Washington, v. 26, n. 5, p. 195-219, Nov. 1923.

MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potencial to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, n. 1, p. 131-136, 1995.

MUNKVOLD, G. P. Seed pathology progress in academia and industry. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 47, p. 285-311, 2009.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: MacMillan, 1979. 838 p.

PASTOR-CORRALES, M. A.; ABAWI, G. S. Reactions of selected bean germplasms to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Plant Disease**, Quebec, v. 71, p. 990-993, 1987.

PEREIRA, M. J. Z.; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B. Inheritance of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli* brazilian race 2 in common bean. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 6, p. 788-792, Nov./Dec. 2009.

PRADO, P. E. R. et al. Eficácia do tratamento químico de sementes de algodão em relação ao potencial de inóculo de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas. **Anais...** Sete Lagoas: EMBRAPA, 2002. p. 52.

SANTOS, A. C. K. S. ***Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro**: detecção, inoculação artificial e controle químico. 1995. 68 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1995.

SANTOS, G. R. et al. Transporte, transmissibilidade e patogenicidade da micoflora associada às sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 43, n. 249, p. 621-627, 1996.

SCHWARTZ, H. F. et al. (Ed.). **Compendium of bean diseases**. 2<sup>nd</sup> ed. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 2005. 120 p.

SINGH, D.; MATHUR, S. B. Location of fungal hyphae in seeds. In: \_\_\_\_\_. **Hystopathology of seed-borne infections**. Boca Raton: CRC, 2004. p.101-168.

SOUSA, M. V. et al. Metodologia de infecção artificial de sementes de algodão por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas. **Anais...** Sete Lagoas: EMBRAPA, 2002. p. 70.

SOUSA, M. V. et al. Métodos de inoculação e efeitos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfectum* em sementes de algodoeiro. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 33, p. 41-48, jan./fev. 2008.

SOUSA, M. V. et al. Real-time quantitative PCR assays for the rapid detection and quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in *Phaseolus vulgaris* (common bean) seeds. **Plant Pathology**, Lavras, v. 64, p. 478-488, 2015.

TANAKA, M. A. S.; MACHADO, J. C. Patologia de sementes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, p. 40-46, 1985.

TANAKA, M. A. S.; MENTEN, J. O. M. Comparação de métodos de inoculação de sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 17, p. 218-226, 1991.

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

TOLEDO-SOUZA, E. D. et al. Fusarium wilt incidence and common bean yield according to the preceding crop and the soil tillage system. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 8, p. 1031-1037, ago. 2012.

VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap. 4, p. 1-26.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A

Tabela 2 Resumo da análise de variância da germinação no método A.

Fonte de variação	G.L.	Q.M.	F	Pr>F
Concentração de inóculo	2	442,866	35,398	0,000*
Período de embebição	4	655,000	52,353	0,000*
Concentração x Período	8	41,700	3,333	0,0045*
Erro	45	12,511		
C.V. (%)	4,25			

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 3 Resumo da análise de variância do IVE do método A.

Fonte de Variação	G.L.	Q.M.	F	Pr>F
Concentração de inóculo	2	2,160	4,591	0,0157 *
Período de embebição	4	1,068	2,270	0,0777 <sup>NS</sup>
Concentração x Período	8	0,955	2,031	0,0659 <sup>NS</sup>
DBC	3	0,335	0,712	0,5503 <sup>NS</sup>
Erro	42	0,470		
C.V. (%)	20,30			

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

<sup>NS</sup> Não significativo.

Tabela 4 Resumo da análise de variância do estande inicial do método A.

Fonte de Variação	G.L.	Q.M.	F	Pr>F
Concentração de inóculo	2	532,466	5,280	0,0090*
Período de embebição	4	1351,233	13,400	0,0000*
Concentração x Período	8	121,883	1,209	0,3175 <sup>NS</sup>
DBC	3	68,222	0,677	0,5713 <sup>NS</sup>
Erro	42	100,841		
C.V. (%)	28,00			

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

<sup>NS</sup> Não significativo.

Tabela 5 Resumo da análise de variância do estande final do método A.

Fonte de Variação	G.L.	Q.M.	F	Pr>F
Concentração de inóculo	2	47,400	1,051	0,3587 <sup>NS</sup>
Período de embebição	4	1474,666	32,691	0,0000*
Concentração x Período	8	16,691	0,370	0,9305 <sup>NS</sup>
DBC	3	44,466	0,986	0,4087 <sup>NS</sup>
Erro	42	45,109		
C.V. (%)	10,10			

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

<sup>NS</sup> Não significativo.

Tabela 6 Resumo da análise de variância do índice de doença do método A.

Fonte de Variação	G.L.	Q.M.	F	Pr>F
Concentração de inóculo	2	8,150	0,267	0,7670 <sup>NS</sup>
Período de embebição	4	7402,525	242,472	0,0000*
Concentração x Período	8	35,837	1,174	0,3373 <sup>NS</sup>
DBC	3	17,172	0,562	0,6427 <sup>NS</sup>
Erro	42	30,529		
C.V. (%)	12,69			

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

<sup>NS</sup> Não significativo.

Tabela 7 Resumo da análise de variância da condutividade elétrica do método A.

Fonte de Variação	G.L.	Q.M.	F	Pr>F
Concentração de inóculo	2	32678,635	7,597	0,0014*
Período de embebição	4	42789,403	9,947	0,0000*
Concentração x Período	8	8297,779	1,929	0,0788 <sup>NS</sup>
Erro	45	4301,722		
C.V. (%)	6,70			

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

<sup>NS</sup> Não significativo.

Tabela 8 Resumo da análise de variância da germinação do método B.

Fonte de variação	G.L.	Q.M.	F	Pr>F
Período de embebição	4	650,300	22,528	0,0000*
Erro	15	28,866		
C.V. (%)	6,83			

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 9 - Resumo da análise de variância do IVE do método B.

Fonte de variação	G.L.	Q.M.	F	Pr>F
Período de embebição	4	2,347	2,901	0,0682 <sup>NS</sup>
DBC	3	0,444	0,549	0,6580 <sup>NS</sup>
Erro	12	0,809		
C.V. (%)	30,42			

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

<sup>NS</sup> Não significativo.

Tabela 10 Resumo da análise de variância do estande inicial do método B.

Fonte de variação	G.L.	Q.M.	F	Pr>F
Período de embebição	4	868,800	24,682	0,0000*
DBC	3	49,866	1,417	0,2861 <sup>NS</sup>
Erro	12	35,200		
C.V. (%)	16,57			

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

<sup>NS</sup> Não significativo.

Tabela 11 Resumo da análise de variância do estande final do método B.

Fonte de variação	G.L.	Q.M.	F	Pr>F
Período de embebição	4	1362,800	26,827	0,0000*
DBC	3	11,466	0,226	0,8767 <sup>NS</sup>
Erro	12	50,800		
C.V. (%)	10,83			

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

<sup>NS</sup> Não significativo.

Tabela 12 Resumo da análise de variância do índice de doença do método B.

Fonte de variação	G.L.	Q.M.	F	Pr>F
Período de embebição	4	4461,825	151,978	0,0000*
DBC	3	8,316	0,283	0,8366 <sup>NS</sup>
Erro	12	29,358		
C.V. (%)	10,39			

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

<sup>NS</sup> Não significativo.

Tabela 13 Resumo da análise de variância da condutividade elétrica do método B.

Fonte de variação	G.L.	Q.M.	F	Pr>F
Período de embebição	4	264315,275	24,772	0,0000*
Erro	15	10670,038		
C.V. (%)	8,31			

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 14 Resumo da análise de variância da germinação do método C.

Fonte de variação	G.L.	Q.M.	F	Pr>F
Período de embebição	5	6331,801	393,456	0,0000*
Erro	18	16,092		
C.V. (%)	9,29			

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 15 Resumo da análise de variância do IVE do método C.

Fonte de variação	G.L.	Q.M.	F	Pr>F
Período de embebição	5	7,521	24,920	0,0000*
DBC	3	0,244	0,811	0,5074 <sup>NS</sup>
Erro	15	0,301		
C.V. (%)	27,06			

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

<sup>NS</sup> Não significativo.

Tabela 16 Resumo da análise de variância do estande inicial do método C.

Fonte de variação	G.L.	Q.M.	F	Pr>F
Período de embebição	5	1754,800	65,478	0,0000*
DBC	3	16,666	0,622	0,6117 <sup>NS</sup>
Erro	15	26,800		
C.V. (%)	25,25			

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

<sup>NS</sup> Não significativo.

Tabela 17 Resumo da análise de variância do estande final do método C.

Fonte de variação	G.L.	Q.M.	F	Pr>F
Período de embebição	5	3375,066	60,703	0,0000*
DBC	3	118,000	2,122	0,1402 <sup>NS</sup>
Erro	15	55,600		
C.V. (%)	17,01			

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

<sup>NS</sup> Não significativo.

Tabela 18 Resumo da análise de variância do índice de doença do método C.

Fonte de variação	G.L.	Q.M.	F	Pr>F
Período de embebição	5	5835,341	354,194	0,0000*
DBC	3	38,041	2,309	0,1179 <sup>NS</sup>
Erro	15	16,475		
C.V. (%)	5,82			

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

<sup>NS</sup> Não significativo.

Tabela 19 Resumo da análise de variância da condutividade elétrica do método C.

Fonte de variação	G.L.	Q.M.	F	Pr>F
Período de embebição	5	688159,320	67,574	0,0000*
Erro	18	10183,851		
C.V. (%)	7,09			

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

## APÊNDICE B

Tabela 20 Médias obtidas para índice de velocidade de emergência nas diferentes concentrações de embebição no método A.

Concentração de inóculo	IVE
$10^6$	3,74 a
$10^5$	3,28 ab
$10^4$	3,11 b
C.V. (%)	20,30

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 21 Médias obtidas para estande inicial nas diferentes concentrações de embebição no método A.

Concentração de inóculo	Estande Inicial
$10^6$	41,70 a
$10^5$	31,90 b
$10^4$	34,00 ab
C.V. (%)	28,00

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 22 Médias obtidas para estande final nas diferentes concentrações de embebição no método A.

Concentração de inóculo	Estande Final
$10^6$	65,20 a
$10^5$	66,10 a
$10^4$	68,20 a
C.V. (%)	10,10

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 23 Médias obtidas para índice de doença nas diferentes concentrações de embebição no método A.

Concentração de inóculo	Índice de doença
$10^6$	43,70 a
$10^5$	44,10 a
$10^4$	42,85 a
C.V. (%)	12,69

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 24 Médias obtidas para condutividade elétrica nas diferentes concentrações de embebição no método A.

Concentração de inóculo	Condutividade elétrica
$10^6$	1024,49 a
$10^5$	964,97 b
$10^4$	947,35 b
C.V. (%)	6,70

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.