

CONTROLE QUÍMICO DO “DAMPING-OFF” DO TOMATEIRO  
(*Lycopersicon esculentum* MILL.) CAUSADO POR *Pythium*  
*aphanidermatum* (EDSON) FITZ., E SEU EFEITO SOBRE A  
MICROFLORA DO SOLO.

HERCULES MARTINS E SILVA

Engenheiro Agrônomo - EMBRAPA

Orientador: Dr. PAULO C. T. CARVALHO

Dissertação apresentada à Escola Superior  
de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Univer-  
sidade de São Paulo, para a obtenção  
do Título de Mestre em Fitopatologia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Julho de 1977

À

memória de minha mãe INÊS ANA.

Ao meu pai MANOEL a quem tudo devo,  
minha gratidão.

A

minha esposa FÁTIMA,

A minha filha INÊS FABIANA,

dedico.

## AGRADECIMENTOS

O autor pretende expressar os seus melhores agradecimentos:

Ao Prof. Dr. PAULO DE CAMPOS TORRES DE CARVALHO, pela orientação, incentivo e ensinamentos constantes, revisões e sugestões;

Ao Prof. Dr. TASSO LEO KRUGNER, pelas sugestões, revisões e ensinamentos;

A Profª Drª ELKE J.B. NOGUEIRA CARDOSO, pela revisão dos originais, sugestões e ensinamentos;

Ao Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pela oportunidade concedida para frequentar o C.P.G. e facilidades para a realização do trabalho.

À EMBRAPA, pelo apoio e facilidades concedidas para a realização do Curso;

Aos Professores, Colegas do Curso e Funcionários do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, pelos ensinamentos, amizades e apoio constantes;

Ao Prof. FERNANDO CARNEIRO DE ALBUQUERQUE, da FCAP, pelos ensinamentos e incentivo.

Aos colegas de Curso: ENEIDA ASSUNÇÃO, JOSÉ MARIA G. FERRAZ, JOSÉ C. TOSIN, OFÉLIA R. GOMES e PAULO CHIACCHIO, pela colaboração na montagem dos experimentos;

Ao M.S. ANTONIO CARLOS DIAS DE TOLEDO, pelo fornecimento dos fungicidas;

Ao Departamento de Agricultura da ESALQ, através da Seção de Sementes, pelo fornecimento de sementes;

Às bibliotecárias e funcionários da Biblioteca Central da ESALQ, pelo apoio concedido.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

## Í N D I C E

|   | <u>Página</u> |
|---|---------------|
| 1. RESUMO . . . . .   | 1             |
| 2. INTRODUÇÃO . . . . .   | 2             |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA . . . . .  | 4             |
| 3.1. Características Gerais do Gênero <u>Pythium</u> . . . . .                      | 4             |
| 3.2. Sobrevivência de <u>Pythium</u> spp. nos solos . . . . .                       | 5             |
| 3.3. Controle Químico do "Damping-off" . . . . .                                    | 12            |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS . . . . .   | 21            |
| 4.1. Meios de Cultura . . . . .   | 21            |
| 4.2. Solo . . . . .   | 25            |
| 4.3. Sementes . . . . .   | 25            |
| 4.4. Fonte de Inóculo . . . . .   | 25            |
| 4.5. Fungicidas Usados . . . . .  | 25            |
| 4.6. Isolamento de <u>Pythium aphanidermatum</u> . . . . .                          | 27            |
| 4.7. Produção de Oosporos e Preparo do Inóculo . . . . .                            | 27            |
| 4.8. Teste de Patogenicidade . . . . .  | 28            |
| 4.9. Controle Químico do "Damping-off" de Pré-Emergência em<br>Tomateiros . . . . . | 29            |
| 4.10. Efeito do Controle Químico sobre a Microflora do Solo. . . . .                | 31            |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO . . . . .   | 33            |
| 5.1. Isolamento . . . . .   | 33            |
| 5.2. Produção de Oosporos . . . . .   | 33            |
| 5.3. Teste de Patogenicidade . . . . .  | 35            |
| 5.4. Controle Químico do "Damping-off" . . . . .                                    | 36            |
| 5.5. Efeito dos Fungicidas sobre a Microflora do Solo . . . . .                     | 39            |
| 6. CONCLUSÕES. . . . .  | 53            |
| 7. SUMMARY . . . . .  | 54            |
| 8. LIT ERATURA CITADA . . . . .   | 55            |
| 9. APÊNDICE . . . . .   |               |

## 1. RESUMO

No presente trabalho, foi procedido o isolamento de Pythium aphanidermatum (EDSON) Fitz., do solo, utilizando-se sementes de cânhamo (Cannabis sativa L.) como isca. Foram utilizadas técnicas de produção de oosporos, tratando micélio do fungo, cultivado em meio V-8-ágar + Colesterol, com extrato de solo não estéril, com o objetivo de dar mais uniformidade ao inóculo e maior precisão no método de inoculação. Foi estudado o controle químico do "damping-off" de pré-emergência do tomateiro (Lycopersicon esculentum Mill.), causado por P. aphanidermatum, através do tratamento de sementes com os fungicidas PCNB, Carboxin, Thiram, Lesan e Cloreto de Metoxi-etil Mercúrio. Foram utilizados os métodos de tratamento de sementes a seco, "pellet" e úmido.

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, sendo utilizado solo não estéril, contido em vasos de barro de 27 x 27 x 10 cm. As sementes tratadas foram inoculadas, após o plantio, com uma suspensão contendo  $6 \times 10^4$  oosporos por ml.

Finalmente, foi estudado o efeito do controle químico sobre a população, e grupos funcionais de microrganismos do solo, especialmente sobre aqueles que participam dos processos de proteólise, fixação aeróbia e anaeróbia, amonificação, nitrificação e desnitrificação.

## 2. INTRODUÇÃO

O gênero Pythium Pringsheim pode ser considerado de distribuição mundial, e ocupa uma diversidade de habitats provavelmente não excedida por qualquer outro gênero de fungos. Espécies de Pythium têm sido referidas como parasitas em algas, em plantas de diversos ambientes aquáticos, além de terem sido apontadas como parasitas de cerca de 80 espécies de plantas cultivadas, entre as quais o tomateiro (Lycopersicon esculentum Mill.). Embora considerados primariamente como patógenos de sementes e de plântulas, Pythium spp são responsáveis por doenças em folhagem, podridões de raízes em plantas adultas e podridões moles em frutos maduros e legumes, tanto no campo, como armazenados ou em trânsito.

No cultivo de tomate para a indústria, em que os plantios são feitos diretamente no campo, Pythium aphanidermatum (EDSON) Fitz., é o causador de grandes perdas para os agricultores, por reduzirem o stand final de tomateiros.

Disso resulta o interesse dos agricultores em controlar espécies habitantes do solo, sendo de fundamental importância no controle do patógeno o conhecimento da natureza e sobrevivência das estruturas capazes de persistir no solo e de agir como inóculo primário.

Vários fungicidas são comumente citados como eficientes no controle de moléstias causadas por espécies de Pythium, e, a cada ano mais produtos são descobertos devido ao crescente avanço da pesquisa industrial.

No entanto, apesar do grande número de produtos específicos para determinados grupos de microrganismos, pouco se conhece sobre o efeito que esses produtos exercem sobre a microflora do solo.

A importância que tem o solo como base nutritiva para as plantas e o papel que os microrganismos desempenham no ciclo dos elementos nos solos, nas transformações de sua estrutura e composição, justificam a preocupação que devemos ter em buscar o conhecimento do efeito dos defensivos agrícolas sobre as populações de microrganismos no solo.

No presente trabalho, pretende-se estudar o isolamento de P. aphanidermatum, técnicas de produção de oosporos desse fungo, e controle químico do "damping-off" de pré-emergência do tomateiro, causado pelo mesmo. Além disso, pretende-se estudar também o efeito desse controle sobre a microflora do solo, especialmente sobre os grupos funcionais que participam dos processos de proteólise, amonificação, fixação aeróbica e anaeróbica, nitrificação e desnitrificação.



### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Características gerais do gênero Pythium

O gênero Pythium foi estabelecido por Pringsheim, em 1858, e suas espécies foram originalmente de interesse exclusivo dos micologistas, mas ao ser encontrado causando doenças de raízes em várias plantas, sua identificação tornou-se importante para os fitopatologistas (HENDRIX e CAMPBELL, 1973).

Várias monografias foram escritas sobre o gênero Pythium nas quais são apresentadas descrições de espécies, relações interespecíficas, caracteres morfológicos, listas de hospedeiros, ilustrações e outras características, sendo que neste trabalho foram consultadas as monografias de MATTHEWS (1931), MIDDLETON (1943), SPARROW (1960).

CAMPBELL e HENDRIX (1973) estudaram a etiologia das doenças causadas por Pythium e verificaram que a maioria das espécies de Pythium atacam principalmente tecidos jovens ou suculentos. Elas muitas vezes restringem o seu parasitismo a "seedlings", extremidades de raízes secundárias mais delicadas, além de frutos. O fungo não se espalha amplamente

através das células do hospedeiro, e é rapidamente suprimido por outros fungos mais agressivos ou de crescimento mais rápido. Espécies de Pythium também provocam podridão em sementes, causando o "damping-off" de pré-emergência. Infectam plântulas recém-emergidas, ao nível do solo, causando tombamento e morte das plantas em sementeiras, sintoma comum de "damping-off" de pós-emergência. Em florestas naturais e solos não agrícolas, a morte de plântulas por "damping-off" ou por podridão de raízes não é normalmente relatada. Este patógeno através de seletiva eliminação de espécies de plantas suscetíveis, pode agir como potente determinante do tipo de vegetação de uma área. Desta forma, ao lado de outros fatores do solo, possibilitaria a seleção natural de plantas, assumindo grande importância ecológica, segundo CAMPBELL e HENDRIX (1973).

### 3.2. Sobrevivência de Pythium spp nos solos

O conhecimento da forma de sobrevivência de um patógeno é de significativa importância nos estudos de controle e epidemiologia.

GARDNER e HENDRIX (1973) verificaram que espécies de Pythium sobrevivem no solo através do crescimento saprofítico e de estruturas de resistência. Elas não são vigorosas competidores e sua atividade saprofítica fica por isso bastante resumida. Geralmente elas crescem saprofiticamente somente sob circunstâncias onde outros organismos ou não estão presentes ou têm suas atividades reduzidas por fatores ambientais adversos, sendo a tolerância à alta umidade do solo uma vantagem ecológica para a espécie. Verificaram também que elevados níveis de CO<sub>2</sub> no solo favorecem a atividade saprofítica de P. irregulare e P. vexans, não reduzindo o nível de O<sub>2</sub>. O papel do crescimento saprofítico de Pythium spp. como mecanismo de sobrevivência é importante principalmente porque o fungo é capaz

de colonizar substratos virgens rapidamente e porque é possível o seu crescimento sob condições desfavoráveis a outros microrganismos.

BARTON (1961) e STANGHELLINI e HANCOCK (1971) consideram que a sobrevivência como estrutura de resistência é mais importante do que a sua persistência como saprófita. O micélio de Pythium sofre lise tão logo a fonte de alimento é esgotada, ou torna-se colonizada por organismos competidores.

AYERS e LUMSDEN (1975) consideram que os principais mecanismos de sobrevivência do fungo são: por meio de zoosporos e esporângios para pequenos períodos e por meio de oosporos para longos períodos. Algumas condições que favorecem o desenvolvimento e subsequente germinação de oosporos são conhecidas para certas espécies, especialmente para Pythium aphanidermatum, mas não para muitas outras.

LUNA e HINE (1964) verificaram que Pythium spp. tem sido isolado tanto de solo cultivado como de solo virgem, e que persiste no solo por extensos períodos de tempo, em ausência de substrato colonizável. A natureza exata do propágulo responsável pela sobrevivência inter-substrato é pouco conhecida. A persistência no solo como micélio é inviável em virtude da efêmera duração deste.

Espécies com ampla gama de hospedeiros e amplos requisitos nutricionais, podem ser capazes de sobrevivência na forma miceliana em climas tropicais e em ambientes controlados, onde contínuo suprimento de matéria orgânica fresca é adicionado.

Pouca informação existe sobre a persistência de zoosporos, tanto móveis como encistados, em solos de campo. Pythium aphanidermatum

foi reisolado de solo infestado com zoosporos, após 7 dias, umidecendo esse solo.

No entanto, BURR e STANGHELLINI (1973) não conseguiram reisolado zoosporos de solo exposto ao ar seco durante 12 horas. Uma vez que os zoosporos encistados germinam rapidamente em solo natural de campo e em água sem a adição de nutrientes, seu potencial de sobrevivência deverá ser de extremamente baixa duração.

STANGHELLINI (1974) considera que sob condições de agricultura intensiva, esporângios e oosporos são provavelmente as estruturas capazes de maior persistência no solo, na ausência de hospedeiro suscetível. Em espécies de esporângios lobados, os oosporos são aparentemente a primária - se não a única - estrutura de sobrevivência. Esporângios lobados são tão efêmeros quanto micélio.

BURR e STANGHELLINI (1973) verificaram que oosporos de P. aphanidermatum produzidos em tecidos colonizados são aparentemente dormentes. Geralmente menos de 10% deles são capazes de germinar sob delicadas condições nutricionais e ambientais. Sofrendo liberação do hospedeiro durante a decomposição natural, os oosporos persistem no solo e são capazes de germinar 80 a 100% quando condições especiais de ambiente e nutricionais estão presentes. A exata natureza desta mudança em dormência não é bem conhecida mas presumivelmente resulta de alterações enzimáticas na permeabilidade da parede celular do oosporo, segundo os mesmos autores.

STANGHELLINI (1974) sugere que o sucesso do patógeno em colonizar o substrato é dependente da percentagem da população do fungo dormente no solo, capaz de germinar uma vez que é unicamente esta porção da população que irá funcionar como inóculo primário efetivo.

VAARTAJA e BUMBIERIS (1964) encontraram abundantes propágulos de Pythium sp. em vários viveiros de coníferas, com pouca ou nenhuma doença. Eles sugerem que fatores biótipos seriam responsáveis pela baixa incidência da doença. Um desses fatores poderia ser a fungistase do solo, a qual pode ser anulada pela adição de nutrientes, por tratamento térmico e por adição de extrato de solo filtrado. Esse efeito tem sido bem demonstrado para outros fungos, embora seja pouco conhecido no caso específico de Pythium spp.

JACKSON (1958) concluiu que a germinação de conídios de Penicillium citrinum aumentava com a adição de um monossacarídeo ao solo. Dissacarídeos e trissacarídeos tiveram menor efeito, enquanto sais minerais e amino-ácidos não inibiram a fungistase. Entretanto, SCHREIBER e GREEN (1963) demonstraram que conídios de Verticillium albo-atrum germinaram bem em solo suprido com aminoácidos.

Segundo WELTZIEN, citado por AGNIHOTRI e VAARTAJA (1967), certos açúcares e amino-ácidos estimulam a germinação de conídios de Aspergillus fumigatus no solo. Exsudatos de raízes também inibem o efeito de fungistase e estimulam a germinação de propágulos dormentes no solo. A variável efetividade de inóculos patogênicos em causar infecções pode ser assumida como dependente de um delicado balanço dinâmico que existe entre o grau de fungistase e fatores que o anulam. A sobrevivência de propágulos de fungos no solo tem sido insuficientemente investigada, principalmente pela falta de metodologia adequada. Esporângios e oosporos de Pythium são ideais para esses estudos por causa do seu tamanho.

GARRET (1956) indica que a infecção de partes subterrâneas de plantas por um patógeno requer suficiente inóculo às proximidades do hospedeiro, e, uma fonte de energia prontamente disponível.

AGNIHOTRI e VAARTAJA (1967) afirmam que a exsudação de com

postos orgânicos, pelas raízes de plantas e pelas sementes germinando, pode suprir a fonte de energia requerida pelos patógenos de plântulas e de raízes de plantas adultas. O aumento em número do parasita pode então incrementar a infecção do hospedeiro.

KRAFT et alii (1967) verificaram que embora a infecção por zoosporos isolados possa causar a morte da célula invadida, a hifa infectiva não coloniza as células adjacentes em 24 horas. Isto sugere que a infecção por massas de zoosporos é necessária para a severa necrose e subsequente colonização das raízes. GAUMAN (1950) postulou que aumentando a quantidade de inóculo aumenta a incidência e severidade da doença, causada pela ação da massa de propágulos do fungo capaz de penetrar no hospedeiro.

Alguns autores, como FLENTJE e SAKSENA (1964), SCHROTH e SNYDER (1961), demonstraram que sementes de plantas de variedades mais suscetíveis ao "damping-off" de pré-emergência exsudavam maiores quantidades de amino-ácidos e açúcares durante a germinação. Fatores físicos tais como temperatura e umidade são importantes também para a infecção.

KRAFT e ERWIN (1967) estudaram o efeito da temperatura na qualidade e quantidade de exsudatos de sementes de feijão germinando e o efeito desses exsudatos no crescimento e patogenicidade de P. aphanidermatum. Concluíram que baixas quantidades de amino-ácidos e açúcares exsudados das sementes causaram pequenas respostas no crescimento, mas afetaram a patogenicidade do fungo, sugerindo que reações semelhantes possam ocorrer no solo. Uma resposta relativamente pequena em crescimento poderá ser suficiente para a infecção, especialmente quando esta é iniciada por um simples tubo germinativo. Sob condições naturais, a concentração de nutrientes junto às sementes seria difícil de determinar, porque pouco é conhecido sobre o volume de solo no qual os exsudatos se difundem.

BARTON (1961) e STANGHELLINI e BURR (1973) demonstraram que oosporos de P. mammilatum foram estimulados a germinar em resposta aos exsudatos de raízes em solo no campo. A germinação dos oosporos no solo começou após 3 horas e atingiu um máximo de 92%, seis horas após o solo ter sido suplementado com exsudatos de sementes de feijão. Oosporos de P. aphanidermatum germinaram tanto direta como indiretamente no solo. O modo de germinação, entretanto, foi governado pela presença ou ausência de fonte de nutrientes exógenos e de água livre. Os oosporos germinaram exclusivamente por tubos germinativos que continuaram a crescer e eventualmente terminavam em esporângio ou penetravam diretamente no hospedeiro, sem formar esporângios. Além de agirem como a principal estrutura de sobrevivência do fungo, os oosporos também funcionam como unidade infectante primária.

De acordo com STANGHELLINI e BURR (1973), embora zoosporos possam ser produzidos a alguma distância das raízes, sua efetividade como inóculo primário pode ser considerada menor que a de oosporos germinando através de tubo germinativo nas imediações das raízes. A função dos zoosporos poderá ser atribuída a disseminação.

Oosporos de P. aphanidermatum uma vez que são estimulados a germinar em ausência de substrato colonizável, são incapazes de retomar a forma de estrutura de resistência no solo. Isto sugere a possibilidade de um controle biológico pela redução da densidade do inóculo, através da incorporação ao solo de materiais capazes de estimular a germinação de oosporos em ausência do hospedeiro.

AYERS e LUMSDEN (1975) verificaram que a adição de colestrol em meio de cultivo V-8 Ágar, aumentava a produção e maturação de oosporos de P. aphanidermatum, P. ultimum e P. myriotilum. As temperaturas de

15°C a 35°C foram satisfatórias para a produção de oosporos de P. aphanidermatum, sendo 25°C a temperatura mais adequada para o crescimento do fungo. Os mesmos autores conseguiram obter oosporos de P. aphanidermatum tratando placas contendo micélio do fungo com extrato de solo não estéril. Esse tratamento provoca a lise do micélio do fungo, com posterior produção de intensa quantidade de oosporos sobre o meio de cultivo.

MIRCETICH e FOGLE (1969) afirmam que a patogenicidade de Pythium é algumas vezes difícil de demonstrar. Como é o caso de outros patógenos, Pythium spp. não são patogênicos sob todas as condições ambientais e, possivelmente, eles são mais dependentes das condições do ambiente do que muitos outros patógenos, particularmente no que diz respeito à umidade e temperatura, devido à sua baixa capacidade de competição com outros organismos do solo. Em casos onde esses fatores têm sido ignorados ou relegados a plano secundário, alguns autores não têm conseguido resultados satisfatórios.

GRIFFIN (1963), ROTH e RIKER (1943) apontam entre outros fatores de menores efeitos ou efeitos indiretos mas de grande importância, que podem afetar a intensidade das doenças causadas por Pythium, a concentração hidrogeno-iônica.

YALE e VAUGHAN (1962) constataram que geralmente o principal efeito é a redução do vigor do hospedeiro em condições ambientais desfavoráveis, mantendo a planta em estado de suscetibilidade por um período mais longo. Nitrogênio na forma de nitrato + potássio, reduziram o "damping-off" em solo úmido, enquanto que com amônio + fosfato tal não ocorreu. Uma vez que este efeito não foi verificado em solo seco, ele foi associado à atividade microbiana do solo.

McCLURE, citado por HENDRIX e CAMPBELL (1973), verificou que



plantas de pepino deficientes em nitrogênio foram mais suscetíveis ao "damping-off" do que aquelas que tiveram suprimento adequado de N.

BEACH, citado por HENDRIX e CAMPBELL (1973), assegura que a porcentagem de "damping-off" causado por P. ultimum diminuiu tanto em tomate como em pepino à medida que foi aumentada a adubação nitrogenada.

### 3.3. Controle Químico do "Damping-off"

Segundo HENDRIX e CAMPBELL (1973) a grande importância econômica das perdas causadas pelas pragas e moléstias das plantas cultivadas suscitou nos agricultores e pesquisadores o interesse pelo estudo do controle dos fitopatógenos. Um novo campo da pesquisa industrial surgiu, resultando daí o aparecimento de um grande número de produtos químicos, capazes de ajudar o homem na luta contra os patógenos. Dentre centenas de produtos descobertos e utilizados como fungicidas, são ainda poucos os que controlam eficientemente fungos do solo tais como Pythium spp. Vários autores têm usado fungicidas com o intuito de controlar o "damping-off" causado por espécies de Pythium, contudo são ainda relativamente poucos os resultados concretos sobre esse assunto. A intensificação dos cultivos contribuiu para o aumento do emprego, muitas vezes indiscriminado, de produtos químicos.

Contudo, é pequeno o número de produtos específicos para controlar um determinado patógeno, do que decorre a necessidade de se saber quais os efeitos dessas substâncias sobre a microflora do solo, principalmente sobre os microrganismos que são benéficos às plantas, por colocarem nutrientes, na forma assimilável, à disposição destas.

RONCADORI e McCARTER (1972) verificaram que o tratamento de solo com Dexon (p - dimetrlaminobenzenediazo - sódio - sulfonato), onde ocorria grande incidência de "damping-off" causado por Pythium spp., favoreceu a germinação das sementes, além de estimular o crescimento das plântulas e de mudas de algodoeiro. Dentre vários patógenos do solo, Pythium spp foi o mais eficientemente controlado com o uso de Dexon.

HOCH e HAGEDORN (1974) testaram vários fungicidas em casa de vegetação. Captafol e Dexon foram os mais eficientes no controle de Pythium, Fusarium e Rhizoctonia spp, entretanto, no campo somente Dexon repetiu os resultados obtidos anteriormente.

AHMADINEJAD (1974) isolou de plântulas com sintomas de "damping-off" os seguintes fungos: Phoma betae, Pythium aphanidermatum e Rhizoctonia solani. O autor estudou o efeito do tratamento de sementes no controle da doença, usando os seguintes fungicidas: Carboxin, Cloroneb, Benomil, Captan, PCNB, Ceresan, Thiran, Dexon, Zineb. Os resultados mostraram que Dexon, Carboxin e PCNB foram efetivos no controle da doença. Benomil foi efetivo contra Rhizoctonia mas não contra Pythium aphanidermatum no solo.

VAARTAJA (1964) fez uma exaustiva revisão da literatura existente a respeito do tratamento químico, como medida de controle de doenças de plântulas em sementeiras e em viveiro. Relacionou entre outras medidas de controle o tratamento de sementes, a fumigação do solo e o tratamento do solo com fungicidas orgânicos. Conforme esse autor, o tratamento de sementes consiste numa prática econômica e muitas vezes efetiva para o controle do "damping-off". Tal medida pode ser considerada como um tipo indireto e suave de tratamento do solo, além de proporcionar acréscimos consideráveis na emergência de plântulas ou até mesmo propiciar proteção mais prolongada após a emergência das mesmas.

KRUGNER (1971) considera que os fatores que mais contribuem para o sucesso do tratamento de sementes são: os de ordem ecológica, o potencial de inóculo, a fitotoxidez, o poder adesivo, a dosagem, a decomposição e a lixiviação do fungicida no solo.

No trabalho de VAARTAJA (1964), são listados vários exemplos de controle eficiente do "damping-off" através do tratamento de sementes. O autor cita STRONG (1962) que testou 24 produtos, dos quais somente Captan propiciou efeitos favoráveis e duradouros sobre diversas essências florestais, em solos infectados naturalmente com Pythium spp, Fusarium spp e Rhizoctonia spp. Por outro lado, ao citar os trabalhos conduzidos por LABONTE (1959), destacou a ação fitotóxica ou proteção insuficiente de Captan e Thiram no controle de Pythium, Rhizoctonia e Cylindrocladium spp.

RAM REDDY et alii (1964) constataram a eficiência de Captan e Thiram para o controle do "damping-off" através do tratamento de sementes. Já SETLIFF e HOCKING (1968) observaram inconsistência nos resultados obtidos com vários produtos, incluindo Captan e PCNB, no controle do "damping-off" em viveiros de Pinus spp, na Tanzânia. VAARTAJA e BUMBIERIS (1964) indicam que os fungicidas do solo podem exercer uma dupla ação: diretamente contra o patógeno ou biologicamente, através de alterações na flora do solo, antagônica ao patógeno.

FARLEY e LOCKWOOD (1968) verificaram que a aplicação de PCNB reduz o número de actinomicetos no solo, e em meio de cultura, produzindo desta forma, alteração na flora do solo.

Na literatura brasileira consultada, há poucas referências ao controle químico do "damping-off". Dentre estas pode ser citada: MARTINEZ (1961), que obteve um eficiente controle do "damping-off" em eucalipto, usando fungicidas mercuriais no tratamento de sementes. Contudo, em eucalipto, a doença é causada por uma série de patógenos, dentre os quais Pythium spp é de pouca importância.

CRAM e VAARTAJA (1957) e BIRD (1964) demonstraram que Captan exerce um estímulo no número de bactérias, o qual pode estar ligado a um balanceamento favorável na microflora do solo, que conduza ao estabelecimento de um controle biológico indireto.

Segundo KREUTZER (1963), a seletividade de um fungicida no solo depende da natureza do produto e do grau de exposição ao mesmo. Como natureza do produto o autor considera: 1ª) a intrínseca toxicidade do material, envolvendo o seu modo de ação; 2ª) as propriedades físico-químicas do ingrediente ativo, as quais determinam sua interação com os componentes do solo. O método de aplicação, resultando no grau de exposição ao produto é um importante fator. Finalmente, a seletividade do fungicida poderá ser dependente do tipo de solo no qual o material é introduzido, e mais especificamente da interação solo x fungicida envolvendo a biofase e os componentes físico-químicos do solo.

Respostas morfológicas de um organismo aos fatores ambientais do solo podem alterar o grau de sua suscetibilidade ao fungicida. Tais respostas em fungos são as mais variadas: formação de hifas, desenvolvimento de rizomorfias, escleródios, clamidósporos, oosporos, zoosporos, conídios e outros. Essas estruturas podem variar em resistência aos fungicidas.

DOMSCH, citado por KREUTZER (1963), confirmou que esporos são mais resistentes do que hifas. No entanto, MORGAN (1959) constatou que derivados de fungicidas no solo foram pelo menos 10 vezes mais tóxicos a zoosporos de Phytophthora parasitica, do que a hifas do mesmo fungo.

McKEEN (1954), usando brometo de metila no solo, verificou que os fungos eram destruídos por dosagens muito menores do que bactérias

e actinomicetos. Em níveis nos quais o brometo de metila funcionou como fungicida, houve estímulo no número de bactérias.

Segundo OVERMAN e BURGESS (1956), álcool alil, quando usado em solução aquosa para regar sementeiras, foi tóxico para Pythium spp, Rhizoctonia solani e bactérias nitrificantes, mas não para actinomicetos.

KREUTZER (1963) também afirma que são poucos os pesticidas seletivos e dentre estes, a maioria são fungicidas. Dexon, por exemplo, é um fungicida específico para ficomicetos. LEACH et al (1959, 1960) conseguiram controlar especificamente P. ultimum e P. aphanidermatum através do tratamento de sementes de beterraba. Dexon foi relativamente inefetivo contra Rhizoctonia solani.

TOLMSOFF, citado por KREUTZER (1963), fez um estudo com a finalidade de determinar o modo de ação do Dexon e a razão pela qual esse produto age especificamente sobre Pythium e não sobre Rhizoctonia. O resultado desse trabalho mostrou que Rhizoctonia contém um sistema mitocondrial que decompõe Dexon em presença de difosfopiridina nucleotídeo reduzido. Em Pythium tal sistema parece não estar presente. Dexon não é um produto muito estável e segundo HILLS e LEACH (1962), esse produto se decompõe rapidamente sob a ação direta da luz e em solução aquosa, mas, tem ação altamente específica contra ficomicetos patogênicos do solo.

#### 3.4. Efeito do Controle Químico sobre a Microflora do Solo

Recentemente tem sido dada muita ênfase ao desenvolvimento de produtos químicos que, aplicados em solos infestados, irão controlar doenças causadas por patógenos do solo, pela redução ou eliminação da população dos organismos patogênicos.

Segundo HOUSEWORTH (1973) e AGNIHOTRI et alii (1974), o fungicida ideal seria aquele que eliminasse seletivamente ou inibisse patógenos do solo, quando usados em concentrações não tóxicas a outros microrganismos. A microflora remanescente poderia então servir como uma barreira biológica ao reestabelecimento dos patógenos e, ao mesmo tempo, continuaria suas atividades essenciais à fertilidade do solo.

De acordo com GILMAN, a avaliação das mudanças na população microbiana de um solo é intensamente influenciada pela técnica usada (GILMAN, 1963).

O método comumente empregado de diluições em placas favorece às espécies que esporulam abundantemente e àquelas que têm maior habilidade para crescer em meios de cultivo, sendo prejudicadas as espécies que têm crescimento lento (WARCUP, 1963).

Segundo RICHARDSON (1954), Thiram é um efetivo fungicida contra muitos patógenos de sementes e do solo. Na Índia, esse fungicida tem sido amplamente empregado no tratamento de sementes de diversas espécies vegetais para controlar fungos de solo. O fungicida pode interagir com sistemas biológicos tais como planta x microflora da rizosfera, nodulações de leguminosas e outros. Entretanto, pouco é conhecido acerca do efeito de Thiram, aplicado como protetor de sementes, seguindo práticas agrícolas normais, sobre a rizosfera do solo.

Sementes de cevada (Hordeum vulgare) tratadas com diferentes concentrações de Thiram foram cultivadas sobre camadas de papel de filtro, sob iluminação contínua por 7 dias a 30°C e, a seguir, a altura das plântulas foi medida. O fungicida não influenciou no crescimento das plântulas em nenhuma das concentrações testadas (3000, 6000, 9000 e 12000 ppm).

Para o estudo da população da rizosfera, plântulas foram cultivadas em solo argiloso, pH 7,5, após tratar as sementes com 3000 ppm de Thiram. O método usado foi o de diluições em placas. Os fungos foram estudados em meio de Martin, as bactérias em meio de Allen e os actinomicetos em meio de Conn.

O número de fungos foi igual ao do controle (não tratado). Entretanto, o número de bactérias mostrou uma estimulação inicial, mantendo um número constante, igual ao do controle, após uma semana.

KARANTH et alii (1975) demonstraram que fungicida Dexon estimulou ligeiramente o número total de bactérias, actinomicetos e fungos no solo, além de inibir a conversão de nitrito a nitrato.

JOHNSON, citado por MURTHY e RAGHU (1973), mostrou que o fungicida Thiram é rapidamente convertido em certos demetilcarbamatos conjugados. O autor constatou que esses produtos estimulam as bactérias e os actinomicetos na rizosfera. Tais microrganismos, por sua vez, podem suprimir fungos fitopatogênicos, atuando assim indiretamente como fungicidas.

MURTHY (1976) verificou que os fungos crescendo em associação com diferentes espécies vegetais são diversamente sensíveis ao Thiram e comprovou que os fungos associados às raízes de cevada são mais tolerantes ao Thiram.

KRUGNER (1971) verificou que aplicações repetidas de Captan ao solo reduziram a população de fungos em sementeiras de eucalipto e aumentaram a população de bactérias, tendo o mesmo fato ocorrido com o tratamento do solo usando misturas de PCNB + Dexon + Dithane M-45.

MUNNECKE (1958) verificou que a persistência de fungicidas

não voláteis variou com os fungicidas usados. Sob semelhantes condições, Captan foi muito estável, Semesan foi rapidamente inativado biologicamente, enquanto que Nabam e Ferbam foram inativados não-biologicamente. Ferbam, composto estreitamente relacionado com Thiram, foi inativado com relativa lentidão quando comparado aos resultados obtidos por RICHARDSON, com Thiram.

FASSEN (1974) verificou que 15 dias após a aplicação de 20 partes por milhão de benomil a amostras de solo coletadas em campo experimental e em volta de plantas previamente tratadas com Benomil, o número da microflora total foi 200 e 1000 vezes mais baixo, respectivamente, do que antes do tratamento. Bactérias amilolíticas, celulolíticas e oxidantes de amônio não foram significativamente afetadas pelo tratamento. A amonificação da uréia e desenvolvimento de Azotobacter não foi diferente do controle. Benomil influenciou ligeiramente a evolução de CO<sub>2</sub>. Após 12 semanas significativamente mais (NO<sub>2</sub> + NO<sub>3</sub>) N foi encontrado em solo tratado com Benomil do que no não tratado. A oxidação de nitrito a nitrato "in vitro" foi mais sensível ao tratamento com Benomil do que a oxidação de amônio a nitrito.

MAHMOUD et alii (1972) verificaram que Disyston e Captan tiveram efeitos adversos na quantificação de flora microbiana total, actinomicetos, bactérias nitrificantes e fixadores anaeróbicos do N. O fungicida inibiu fixadores aeróbicos do N, enquanto o inseticida aumentou o número dos mesmos.

Segundo KARANTH et alii (1975), o fungicida Dexon desapareceu no solo dentro de 100 dias. A aplicação do fungicida estimulou ligeiramente o número total de bactérias, actinomicetos e fungos, além de inibir a conversão de nitrito a nitrato mais intensamente do que a oxidação de



amônio a nitrito. Ao mesmo tempo, a oxidação de nitrito por células de resistência de Nitrobacter winogradskii não foi afetada por este fungicida. Baseados nessas observações os autores sugerem que Dexon afeta principalmente a nitrificação heterotrófica no solo. N-N-Dimetil-p-fenilendiamine (DMPDA), o primeiro produto da degradação do Dexon foi igualmente tóxico a Pythium spp, o patógeno contra o qual Dexon é comumente usado.

RONCAGRI e McCARTER (1972) comprovaram que o tratamento do solo com Brometo de metila ou Dexon, onde ocorria grave incidência de "damping-off" causado por Pythium spp., estimulou o crescimento de plântulas de algodoeiro.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

##### 4.1. Meios de Cultura

Foram utilizados no presente trabalho os seguintes meios de cultura:

###### 4.1.1. MPA

(maltose 4 g, peptona 1 g, ágar 7,5 g, água 1.000 ml) auto-clave a 120°C durante 20 minutos.

###### 4.1.2. V-8 Ágar + Colesterol

(Suco V-8 200 ml, CaCO<sub>3</sub> 2,5 g, Colesterol 30 mg/l e H<sub>2</sub>O q.s. p. 1.000 ml).

O Colesterol foi dissolvido em álcool (95%) e adicionado ao meio após a autoclavagem (120°C 20')

## 4.1.3. Solução Salina de Winogradsky

$K_2HPO_4$  5g,  $MgSO_4$  2,5 g, NaCl 2,5 g,  $Fe_2(SO_4)_3$  0,05 g ,  
 $H_2O$  q.s.p. 1.000 ml, pH neutro, autoc. 110°C 20'.

## 4.1.4. Solução de Oligoelementos

Molibdato de Potássio 0,05 g, Borato de Sódio 0,05 g,  
Percloroeto de Ferro 1 gota, Nitrato de Còbalto 0,05 g, Sul-  
fato de Cadmium 0,05 g, Sulfato de Cobre 0,05 g, Sulfato de  
Zinco 0,05 g, Sulfato de Manganês 0,05 g,  $H_2O$  q.s.p. 1.000 ml.  
Autoclavagem 110°C 20'.

## 4.1.5. Extrato de Terra

Solo fértil, misturado a igual volume de água destilada, es-  
terilizado a 127°C durante 1 hora. Esfriado rapidamente a-  
brindo a válvula da autoclave até atingir 110°C. Filtrado  
ainda quente, centrifugado a 10.000 r.p.m. durante 15 minutos.  
pH neutro.

## 4.1.6. Meio de Martin

Peptona 5 g, Fosfato de Potássio Monobásico 1 g, Glucose 10  
g, Sulfato de Magnésio 0,5 g, Rosa Bengal (1:3.000) 100 ml, Á-  
gar 20 g, Sulfato de Estreptomicina (traços).

## 4.1.7. Meio para Determinação de Bactérias

Peptona 10 g, Glicerol 10 g,  $PO_4HK_2$  1,5 g,  $SO_4Mg$  1,5 g, Bac-  
to-ágar 15 g, água destilada q.s.p. 1.000 ml. pH 7,2. Solução  
1:1.000 PCNB 10 ml/l.

#### 4.1.8. Meio para Determinação de Actinomicetes

Glicerol 10 g, Asparaginato de Sódio 1 g, Fosfato de Potás -  
sio Monobásico 1 g, Ágar 15 g, Solução de Oligoelementos 1 ml,  
Água q.s.p. 1.000 ml, pH 7,0 autoclavagem 110°C 20'.

#### 4.1.9. Meio para Estudo da Fixação Aeróbia

Solução Salina 50 ml, Manitol 10 g, Extrato de Solo 10 ml  
Solução de Oligoelementos 1 ml, Carbonato de Cálcio 0,5 g, á-  
gua q.s.p. 1.000 ml, autoclavagem 110°C 20', pH 7,0.

#### 4.1.10. Meio para Estudo da Fixação Anaeróbia

Solução Salina 50 ml, Fosfato Monopotássico 0,75 g, Soda  
0,1 N 33 ml, Glucose 10 g, Extrato de Solo 10 ml, Solução de  
Oligoelementos 1 ml, Água q.s.p. 1.000 ml, autoclavagem 110°C  
20', pH 7,0.

#### 4.1.11. Meio para Estudo da Proteólise

Solução Salina 50 ml, Gelatina 30 g, Solução de Oligoelemen-  
tos 1 ml, Água q.s.p. 1.000 ml, pH 7,2 autoclavagem 110°C 20'.

#### 4.1.12. Meio para Estudo da Amonificação

Solução Salina 50 ml, Asparagina 0,2 g, Solução de Oligoele-  
mentos 1 ml, Água q.s.p. 1.000 ml, autoclavagem 110°C 20'.

## 4.1.13. Meio para Estudo da Nitratação

Solução Salina 50 ml, Nitrito de Sódio 1 g, Carbonato de Cálcio 1 g, Água q.s.p. 1.000 ml, autoclavagem 110°C 20'

## 4.1.14. Meio para Estudo da Nitrosação

Solução Salina 50 ml, Sulfato de Amônio 0,5 g, Carbonato de Cálcio 1 g, Água q.s.p. 1.000 ml, autoclavagem 110°C 20'

## 4.1.15. Meio para Estudo da Desnitrificação

Solução Salina 50 ml, Nitrato de Potássio 2 g, Glucose 10 g, Carbonato de Cálcio 5 g, Solução de Oligoelementos 1 ml, água q.s.p. 1.000 ml, autoclavagem 110°C 20'

## 4.1.16. Meio para Estudo da Fixação Aeróbia

Solução Salina 50 ml, Manitol 10 g, Extrato de terra 10 ml, Solução de Oligoelementos 1 ml, Carbonato de Cálcio 0,5 g, água q.s.p. 1.000 ml, autoclavagem 110°C 20'

## 4.1.17. Meio para Estudo da Fixação Anaeróbia

Solução Salina 50 ml, Fosfato Monopotássico 0,75 g, Soda 0,1 N 33 ml, Glucose 10 g, Extrato de terra 10 ml, Solução de Oligoelementos 1 ml, água q.s.p. 1.000 ml.

#### 4.2. Solo

Foi utilizado solo de boa fertilidade, coletado na região de Piracicaba, pH em torno de 6,0, cultivado continuamente com hortaliças. O solo não foi esterilizado para uso no presente trabalho. Por ocasião da coleta do solo essa área não estava sendo cultivada há seis meses.

#### 4.3. Sementes

Foram utilizadas neste trabalho sementes de tomate variedade Santa Cruz, obtidas de frutos maduros adquiridos no comércio local e preparadas para o plantio. No teste de patogenicidade foram usadas também, sementes de pepino, milho, soja e algodão, fornecidas pela Seção de Sementes da ESALQ, das quais não foi possível indicar as variedades. Tais sementes estavam isentas de qualquer tratamento químico.

#### 4.4. Fonte de Inóculo

Foi utilizada uma cultura de Pythium aphanidermatum, isolada do solo e cultivada em meio V-8 Ágar.

#### 4.5. Fungicidas Usados

Foram usados os fungicidas PCNB, Carboxin, Lesan, Cloreto de metoxietil mercúrio e Thiram, nas vias de tratamento a seco, "Pellet" e úmida, seguindo-se as concentrações recomendadas pelos fabricantes, contidas nas embalagens dos produtos (Quadro 1).

Quadro 1. Fungicidas usados no controle químico do "damping-off" da pré-emergência de tomate

| Nome químico                                    | Nome técnico  | Conc. ing. ativo      | Nome comercial | Conc. utilizada g/kg sementes |
|---|---------------|-----------------------|----------------|-------------------------------|
| penta-cloro-nitro-benzeno                       | PCNB          | 75%                   | BRASSICOL      | 3,00                          |
| p-dimetilamino-benzeno-diazo-sulfato de sódio   | LESAN (DEXON) | 10% Lesan<br>75% PCNB | LESAN          | 3,00                          |
| 5,6-dihidro-2-metil-1,4-oxatien-3-carboxanilida | CARBOXIN      | 75%                   | VITAVAX        | 3,00                          |
| bisulfeto de tetrametil tiuram                  | THIRAM        | 70%                   | RHODIAURAM     | 2,00                          |
| cloreto de metoxietil mercúrio                  | Mercurial     | 25%                   | NEANTINA       | 1,00                          |

#### 4.6. Isolamento e Cultivo de *Pythium aphanidermatum*

Foi utilizada uma cultura de *Pythium aphanidermatum* isolada de solo, trabalhado anteriormente com hortaliças, pelo processo rotineiro empregado para ficomicetos aquáticos, de acordo com CARVALHO (1965): dissolveram-se 10 gramas de solo seco ao ar (passado por uma peneira de malha fina  $1\text{ mm}^2$  - e moída em moinho de bola) em 1 l de água. Agitou-se até homogeneizar. Distribuíram-se em 30 placas de Petri e adicionou-se 1 metade de semente de cânhamo (*Canabis sativa*) por placa. Observou-se depois de dois dias o crescimento do fungo em volta das sementes, formando uma rede de micélio. Retiraram-se, com uma alça de platina, pequenos fragmentos desse micélio e transferiu-se para placas com meio MPA. Incubou-se a 30°C. Após 48 horas verificou-se o crescimento do fungo sobre o meio. Retirou-se, com um vasador de rolhas, um pequeno bloco da periferia da colônia, levando-se para placas de Petri vazias. Sobre o bloco colocou-se uma metade de semente de cânhamo e irrigou-se a placa com água destilada até um limite menor que a superfície do bloco. Em dias posteriores repicou-se o fungo que cresceu em volta da semente, para placas com meio de cultura, purificando-se o isolado. Após o isolamento, o fungo foi transferido para meio V-8 ágar.

#### 4.7. Produção de Oosporos e Preparo do Inóculo

Considerando que os oosporos são as estruturas do patógeno mais eficientes para reproduzir sintomas da doença artificialmente, e, pela maior facilidade de calibragem do inóculo quando são usadas essas estruturas, foi adotada a técnica usual de produção de oosporos, usando extrato de solo (AYERS e LUMSDEN, 1975). Dissolveram-se em um litro de água 10 gramas de solo fresco seco ao ar, agitou-se, deixou-se em repouso durante 24



horas e filtrou-se (em papel filtro Whatman nº 1). Sobre culturas de Pythium aphanidermatum em meio V-8 Ágar + Colesterol, com 6 a 8 dias de idade distribuiu-se 10 a 20 ml do extrato de solo, com aspersor de marca SNIP e incubou-se a 25°C. A partir de 72 horas verificou-se, sob a lupa, que houve lise da massa de micélio cotonoso que antes havia na placa, e em seu lugar apareceram oósporos em profusão.

Com pincel de pelos macios a camada superficial da cultura contendo oósporos foi transportada para um Becker; a seguir fez-se passar esse material por 4 camadas de gase para extrair os restos de micélio. Os oósporos foram lavados duas vezes em água destilada, fazendo-se a cada lavagem uma centrifugação durante 10 minutos a 10.000 r.p.m., para separar os oósporos da água, a fim de eliminar a ação do extrato de solo. Finalmente calibrou-se o inóculo, através de diluições, contando-se os oósporos no hemacitômetro.

O inóculo foi utilizado na concentração de  $6 \times 10^4$  oósporos/ml.

#### 4.8. Teste de Patogenicidade

A patogenicidade do isolado foi testada de duas maneiras:

- a) Inoculando-se "seedlings" de tomate, pepino, soja, algodão e milho, 3 a 5 dias após a emergência das plantinhas;
- b) Inoculando-se as sementes na sementeira por ocasião do plantio.

Com o inóculo calibrado para  $6 \times 10^4$  oósporos/ml foi pipeta-

do 1 ml às proximidades do colo dos "seedlings" e/ou as proximidades das sementes; em vasos de barro de 27 cm de lado por 10 cm de altura. O teste foi feito durante o mês de agosto em condições de casa de vegetação. A umidade foi mantida regando-se os vasos com aspersor de bico-fino, duas vezes ao dia. A temperatura média diária foi de 25°C durante a realização deste estudo. Após cerca de 8 a 10 dias foi feita a observação e contagem do número de plantas vivas. Em cada vaso foram plantadas 40 sementes, sendo duas por cada cova. Estas foram feitas com a extremidade posterior de uma caneta esferográfica comum, e com a profundidade de mais ou menos 2 cm. Cada tratamento teve 3 repetições, cada repetição correspondendo a um vaso, sendo igual número de sementes plantadas sem inocular, servindo como testemunhas.

#### 4.9. Controle Químico do "Damping-off" de Pré-Emergência em Tomateiro

O controle químico em estudo no presente trabalho constou do tratamento de sementes com fungicidas, visando controlar o "damping-off" de pré-emergência do tomateiro.

O delineamento empregado foi o de blocos casualizados com 3 repetições e 17 tratamentos.

Foram utilizados vasos de barro impermeabilizados internamente, de dimensões de 27 x 27 x 10 cm. O solo foi coletado de uma área que não estava sendo explorada no momento, na região de Piracicaba, e que anteriormente fora cultivada com hortaliças. Trata-se de solo de boa fertilidade e não foi esterilizado para utilização neste trabalho; passando-o apenas em peneiras de malha fina (1 mm<sup>2</sup>).

Foi procedido o tratamento de sementes com cinco fungicidas escolhidos, utilizando-se 3 vias: peletização, tratamento a seco e tratamento via úmida. As concentrações usadas foram as recomendadas pelos fabricantes, contidas nos rótulos das embalagens. Para facilitar o tratamento via seca e "pellet", os fungicidas foram veiculados em talco inerte e bem homogeneizados. No tratamento via úmida o produto foi veiculado em água destilada. Visando um melhor controle da área de dispersão dos fungicidas no solo, foi feito o plantio das sementes no interior de tubos de papel parafinado de 0,8 cm de diâmetro por 2,0 cm de comprimento. Cada tubo foi enterrado nos vasos até a metade; efetuou-se o plantio e cobriu-se o restante do tubo com solo, de modo a que os níveis superiores dos tubos e do solo no vaso coincidissem. Logo após o plantio foi pipetado 1 ml do inóculo, (contendo  $6 \times 10^4$  oosporos/ml), em cada tubo. A seguir, os vasos foram uniformemente regados com um aspersor de bico fino, de modo a manter a umidade adequada para o desenvolvimento do fungo e para a germinação das sementes. Nas testemunhas as sementes foram peletizadas e tratadas a seco com talco inerte puro. No tratamento via úmida foram deixadas em água, durante 2 minutos.

Foram utilizados dois tratamentos como testemunha, sendo que no primeiro as sementes foram inoculadas e no segundo não.

A germinação das sementes ocorreu 3 - dias após o plantio. Ao décimo dia foi feita a leitura final, contando-se o número de plantas vivas por tratamento e a altura média dessas plantas (Tabelas 1 e 2).

#### 4.10. Efeito do Controle Químico sobre a Microflora do Solo

Após a leitura dos resultados do controle químico, as plantas foram cortadas ao nível do solo e os vasos deixados secar ao ar por 3 dias. A seguir, os tubos de papel colocados no vaso antes do plantio, foram retirados com uma pinça, e colocados em sacos de papel impermeável, separados por tratamento. As frações de solo, contidas nos tubos, foram retiradas, formando-se uma amostra de solo para cada fungicida, o mesmo ocorrendo com os tratamentos testemunhas. Foram obtidos assim 6 tratamentos, correspondentes aos cinco fungicidas mais a testemunha.

As amostras de solo foram moídas, em moinho de bola marca NORTON, homogeneizadas e pesadas para as diluições em série. De cada amostra de solo foram pesadas 20 g e dissolvidas em frascos contendo 180 ml de água destilada esterilizada. Fez-se a diluição em série de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ .

Para as determinações de fungos, bactérias e actinomicetos, foram utilizados os meios adequados, distribuídos em placas. Estas foram inoculadas com as suspensões de solo de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$ , com cinco repetições. As placas foram incubadas a 28°C, em estufa bacteriológica, sendo feitas as contagens do número de colônias por placa aos 2, 3 e 5 dias após a incubação.

Para as demais determinações, foram utilizadas as técnicas descritas por GIRARD e ROGIEUX (1964). Os resultados foram transformados em número provável de microrganismos por grama de solo, utilizando-se a Tabela de McCRADY, citado pelos mesmos autores. Nas determinações dos amonificantes, nitrosantes, nitratantes e desnitrificantes, foram utilizados processos químicos, tomando-se uma alíquota do meio inoculado após a incu-

bação, e tratando com reativos especiais para determinar a presença de amônia, nitrito e nitrato, produzidos por ação microbiana.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Isolamento

A técnica comum para o isolamento de ficomicetos aquáticos, utilizando semente de cânhamo como isca, foi empregada com sucesso no presente trabalho. Os 26 isolados obtidos, dentre 30 placas usadas no isolamento, comprovam a eficiência do método repetindo o resultado obtido por CARVALHO (1965). Dentre os ficomicetos isolados por esse método, predominou o gênero Pythium, particularmente a espécie P. aphanidermatum, de acordo com as monografias de MATHEWS (1931), MIDDLETON (1943), SPARROW (1960)

### 5.2. Produção de Oosporos

O isolado de Pythium aphanidermatum utilizado no presente trabalho foi cultivado em meio V-8-ágar. Foi obtido um vigoroso crescimento do fungo cultivando-o nesse meio suprido com Colesterol. As placas foram completamente preenchidas por um micélio cotonoso em 3 dias, a 25°C no escuro, o que está de acordo com AYERS e LUMSDEN (1975). A obtenção de oosporos, seguindo-se a técnica de tratar as placas contendo micélio com extrato de solo não estéril, coincidiu plenamente com os resultados ob

tidos por AYERS e LUMSDEN (1975). Esta técnica pode ser utilizada nos trabalhos com Pythium aphanidermatum, bem como com outras espécies de Pythium, apresentando a vantagem de facilitar a calibração do inóculo, dando maior uniformidade nas inoculações, uma vez que outros autores obtiveram grandes variações nos resultados de suas inoculações, provavelmente pelo fato de usarem micélio, e uma mistura de outras estruturas do fungo, em diferentes estágios de maturação, o que daria diferentes respostas em germinação e penetração do patógeno no hospedeiro.

No presente trabalho foi obtida uma percentagem de 80-90% de oosporos maduros, 6-8 dias após o tratamento das placas contendo micélio com extrato de solo, o que poderia ser admitido como provável efeito de uma maior atividade microbiana no solo aqui utilizado, quando comparado àquele utilizado por AYERS e LUMSDEN (1975), uma vez que esses autores obtiveram um índice de oosporos maduros semelhantes, após 14-15 dias.

A adição do colesterol ao meio V-8 favoreceu consideravelmente o crescimento do fungo, comparado ao crescimento em meio sem colesterol. A maturação dos oosporos também foi favorecida pelo uso do colesterol, o que concorda com AYERS e LUMSDEN (1975). A temperatura de 25°C foi adequada para o desenvolvimento rápido do fungo.

O uso do extrato de solo não estéril provocou a lise do micélio de P. aphanidermatum, induzindo o fungo a formar oosporos, o que poderia ser atribuído à ação antagônica da microflora ativa, contida no extrato de solo, a qual forçaria o fungo a formar estruturas de resistência. O efeito de fungistase proporcionado pela atividade dessa flora presente no solo, poderia impedir a germinação dos oosporos. A lavagem desses oosporos e a diluição com água destilada, feita para calibrar o inóculo, proporcionaria uma redução no efeito de fungistase do extrato de solo, o qual se-

ria totalmente anulado pela ação dos exsudatos das raízes germinando, conforme sugerem BARTON (1961), STANGUELLINI (1971 e 1974), AYERS e LUMSDEN (1975), BURR (1973), AGNIHOTRI (1967), FLENTJE e SAKSENA (1964) e SCHROTH e SNYDER (1961).

### 5.3. Teste de Patogenicidade

O sucesso na reprodução de sintomas do "damping-off" em milho, soja, algodão, pepino e tomate (Tabela 1), mostram que P. aphanidermatum apresenta uma gama de hospedeiros bastante ampla, o que concorda com o trabalho de MIDDLETON (1943), que lista uma série de espécies vegetais como hospedeiras desse patógeno. O inóculo, calibrado para  $6 \times 10^4$  oosporos/ml, foi adequado para promover o "damping-off" tanto em pré-emergência, como em pós-emergência.

A inoculação do patógeno em pós-emergência foi menos eficiente do que em pré-emergência, o que poderia ser justificado pela ação dos exsudatos de sementes sobre a germinação dos oosporos do fungo, e, subsequente colonização dos tecidos do hospedeiro, uma vez que esses exsudatos de sementes germinando e de raízes em crescimento, suprem a fonte de energia e nutrientes necessárias ao melhor desenvolvimento do fungo no solo, de acordo com AGNIHOTRI e VAARTAJA (1967). Portanto, a inoculação no solo diminui, provavelmente, a possibilidade de interferência de referidos exsudatos sobre a germinação dos oosporos do fungo.

Das sementes e plântulas infectadas conseguiu-se reisolar o patógeno, através da técnica de isolamento com isca de semente de cânhamo, o que comprova a patogenicidade do isolado utilizado no presente trabalho, segundo os postulados de KOCH.



Tabela 1. Médias de número de plantas vivas 15 dias após a inoculação (3 repetições)

| Hospedeiro | Pré-Emergência <sup>a</sup> | Pós-Emergência <sup>b</sup> |
|------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Algodão    | 43                          | 56                          |
| Milho      | 36                          | 45                          |
| Tomate     | 8                           | 14                          |
| Pepino     | 12                          | 18                          |
| Soja       | 23                          | 31                          |

a = Para cada repetição foram plantadas 100 sementes de um lote com poder germinativo acima de 90%;

b = A inoculação foi feita em 100 plântulas, por repetição, 3 dias após o início da germinação.

#### 5.4. Controle químico do "damping-off"

O fungicida Lesan (sinônimo de Dexon) foi o mais eficiente no controle do "damping-off" de pré-emergência (Tabela 2). Este resultado concorda com aqueles obtidos anteriormente por outros autores, usando Dexon (KARANTH, 1974, e RONCADORI e Mc CARTER, 1972). Tais autores afirmaram que o uso do Dexon estimulou o crescimento de bactérias no solo, o que provocaria um controle indireto do patógeno, pela ativação da flora antagonica. Os resultados dos ensaios microbiológicos mostram que houve realmente um acentuado desenvolvimento de bactérias e actinomicetos no solo tratado com Lesan.

A maior eficiência do Lesan demonstrada no tratamento via seca sobre as vias "pellet" e úmida é contraditória, pois devia-se esperar que a peletização protegesse as sementes por um período mais prolongado ,

do que usando as vias seca e úmida, mas sendo a semente do tomate rugosa, apresentando reentrâncias que podem reter pequenas porções do fungicida, é provável que esse fator tenha contribuído para tal resultado, sem, no entanto, ter sido a única causa.

Tabela 2. Número médio de plantas vivas por tratamento 15 dias após a inoculação das sementes com fungicidas (3 repetições)\*

| Fungicidas | Método de Tratamento |          |         |
|------------|----------------------|----------|---------|
|            | A seco               | Pellet   | Úmida   |
| 1 PCNB     | 15,00f               | 19,33 de | 16,65ef |
| 2 Carboxin | 19,33de              | 26,33c   | 27,33c  |
| 3 Neantina | 19,00de              | 13,66g   | 19,66d  |
| 4 Thiram   | 28,33c               | 27,33c   | 25,66c  |
| 5 Lesan    | 35,00a               | 31,00b   | 27,00c  |

\* Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente.

O resultado obtido com Thiram mostrou que esse produto também é um bom protetor de sementes, coincidindo com as afirmativas de RICHARDSON (1954). Os resultados demonstram que não houve influência da via de tratamento sobre o efeito do fungicida, sendo a mesma eficiência demonstrada nos tratamentos por via seca, "pellet" e via úmida; quando se utilizou o Thiram.

Semelhantes aos resultados do Thiram, foram os obtidos com Carboxin, nas vias "pellet" e úmida. O tratamento via seca não apresentou um bom controle. O PCNB, que é conhecido como um fungicida específico para controlar Rhizoctonia, mostrou-se, nas condições deste trabalho,

ineficiente no controle de Pythium. A maior intensidade dos sintomas de "damping-off", verificada nos tratamentos com PCNB e Neantina, sugerem que provavelmente esses fungicidas favoreceram ao desenvolvimento de Pythium, por inibir os microrganismos antagonísticos presentes ao solo, o que concorda com o trabalho de FARLEY e LOCKWOOD (1968), no qual verificaram que o PCNB reduz a população de actinomicetos no solo.

O tratamento com Neantina foi semelhante àquele com PCNB, mostrando que apesar deste ser um fungicida especificamente recomendado para o tratamento de sementes, não teve efeito sobre P. aphanidermatum, agente de "damping-off", nas condições do presente trabalho, sendo que não foi obtida confirmação na literatura. O tratamento em que as sementes sem receberem fungicidas, foram inoculados, apresentou perda quase total das sementes, demonstrando talvez, a eficiência do método de inoculação utilizado, a influência dos exsudatos de raízes em promover a germinação dos oosporos do fungo e a patogenicidade do isolado estudado.

No tratamento em que não houve inoculação nem aplicação de fungicidas nas sementes, as plântulas se desenvolveram normalmente, apresentando o melhor crescimento dentre todos os tratamentos, o que significa que apesar de o solo não ter sido esterilizado, provavelmente, não havia nenhum patógeno de sementes ativo no seu interior. Comparando-se as alturas de plântulas resultantes do tratamento químico de sementes, verificou-se que as testemunhas não inoculadas apresentaram um desenvolvimento em tamanho de plântulas maior do que todos os outros tratamentos (Tabela 3). Isto sugere que, provavelmente, a inoculação influenciou no crescimento das plântulas, e que a ação do fungo poderia ter prejudicado a absorção de água e nutrientes pelas raízes, sem chegar a causar a morte das plântulas.

Tabela 3. Média de altura das plântulas (cm) provenientes de sementes tratadas com fungicidas 15 dias após a germinação.\*

| Tratamentos              | Método de Tratamento |          |        |
|--------------------------|----------------------|----------|--------|
|                          | A seco               | "Pellet" | Úmida  |
| PCNB                     | 7,94g                | 8,56e    | 7,87gh |
| Carboxin                 | 8,71d                | 6,52j    | 9,63b  |
| Neantina                 | 7,88gh               | 8,14f    | 7,98fg |
| Thiram                   | 8,92c                | 5,17h    | 8,37e  |
| Lesan                    | 7,72h                | 5,88l    | 7,37i  |
| Testemunha inoculada     | 5,00m                | 6,03m    | 6,02m  |
| Testemunha não inoculado | 10,00a               | 11,05a   | 10,06a |

\* Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente

### 5.5. Efeito dos Fungicidas sobre a Microflora do Solo

Os resultados apresentados nas Figuras de 1 a 10 mostram que os fungicidas, utilizados no presente trabalho, tiveram os mais variados efeitos sobre as populações e grupos funcionais estudados. Isto é perfeitamente compreensível, dadas as diferenças entre as formulações químicas desses produtos.

Como o solo é um sistema vivo, onde constantes processos biológicos estão se desenvolvendo, resultando em alterações químicas e físicas, especialmente na rizosfera, toda e qualquer substância adicionada à esse complexo poderá provocar alterações no seu funcionamento. Os fungos, bactérias e actinomicetos, que constituem as populações mais importantes

desse complexo biológico, certamente terão o seu desenvolvimento afetado pelas alterações induzidas.

As respostas desses microrganismos às mudanças ocorridas no seu habitat podem ser as mais diversas. Elas são dependentes de uma série de fatores, ainda pouco conhecidos e extremamente variáveis.

Nas condições do presente trabalho, o fungicida Lesan favoreceu ao aumento do número de bactérias e actinomicetos, sem alterar a população de fungo. Fato semelhante já fora observado por KARANTH (1975) que usou DEXON, sinônimo de Lesan.

Os organismos proteolíticos foram incrementados pelo PCNB e pelo Lesan. Os demais produtos não afetaram este grupo funcional.

O número de organismos que liberam amônia no solo, a partir de compostos orgânicos nitrogenados, foi bastante reduzido pelos fungicidas usados, exceto pelo PCNB, que não afetou tal população. Esse efeito é bastante prejudicial à fertilidade do solo, sendo por isso, de elevada importância agronômica. A obtenção de plantas mais vigorosas a partir de sementes não tratadas com fungicidas (Tabela 3) poderia, assim, ser atribuída a uma redução de amonificação no solo, pelos fungicidas.

Os grupos que realizam as fixações aeróbia e anaeróbia, a nitrificação e a nitratação, não foram afetadas pelos fungicidas usados.

A desnitrificação foi favorecida pela ação dos fungicidas Carboxin, Neantina e Thiram. Este fenômeno concorre para uma perda no teor de N do solo, tendo portanto importância agronômica considerável.

O exato mecanismo responsável por esses fenômenos é pouco co

nhecido. LOCKWOOD (1976) considera que as práticas agrícolas necessárias para a melhor produtividade de uma plantação, podem favorecer a microorganismos patogênicos. Dentre essas práticas, o autor cita, como de grande importância, a aplicação de pesticidas. Citando KATAN e ESHEL, o mesmo autor demonstra que um pesticida pode afetar as doenças de plantas de 4 modos:

a) por efeito direto sobre o patógeno; b) por afetar a virulência do patógeno; c) através do efeito sobre a microflora do solo e d) afetando a planta hospedeira.

Ainda o mesmo autor demonstrou que a aplicação do herbicida atrazina ao solo aumentou a população de Fusarium, intensificando a ocorrência da doença causada por esse patógeno. O autor demonstrou que o mecanismo, nesse caso, foi a estimulação direta do patógeno pelo produto. Verificou também que o fungicida PCNB utilizado para controlar patógenos do solo, tais como Rhizoctonia e Sclerotium spp., provocou um aumento na ocorrência de doenças causadas por patógenos tolerantes ao PCNB, entre eles Fusarium e Pythium. Tais fatos podem ser considerados como resultado da seletiva inibição de componentes da microflora do solo. Quando PCNB foi adicionado ao solo, em ausência de uma fonte de energia, as populações de fungos, bactérias e actinomicetos no solo não foram afetadas. Quando foi adicionada unicamente uma fonte de energia, todos os três componentes aumentaram em número. No entanto, quando a fonte de energia foi adicionada ao solo, em presença de PCNB, actinomicetos foram fortemente suprimidos assim como certos componentes da flora fúngica. Em testes "in vitro", foi confirmado que essas supressões ocorrem por efeito direto do PCNB. A supressão desses maiores componentes da microflora, aparentemente, permite um seletivo aumento naqueles componentes microbianos tolerantes ao PCNB. Estes incluem bactérias e alguns fungos, inclusive patógenos do gênero Fu-

sarium e Pythium. O PCNB também pode causar redução na população dos microrganismos que colonizam saprofiticamente partículas orgânicas no solo .

Em experimentos em estufa, ZAKARIA, citado por LOCKWOOD (1976), o herbicida Cloramben, usado para controlar ervas daninhas em soja, aumentou a severidade da doença das raízes de soja, causada por Thielaviopsis basicola, segundo o mesmo autor. Foi verificado que houve um aumento na germinação dos esporos do patógeno na rizosfera, ocasionado por um estímulo na exsudação de amino-ácidos pelas raízes. Tais exemplos fornecem valiosas informações, não somente para explicar os mecanismos pelos quais as doenças de raízes podem ser aumentadas em severidade, pelo uso de pesticidas, mas também fornecem úteis informações a respeito das tomadas de decisões na hora de escolher o produto a ser usado.

São poucos os trabalhos sobre o efeito dos pesticidas sobre os microrganismos no solo, especialmente sobre grupos fisiológicos específicos. Portanto, os exemplos aqui citados demonstram alguns dos prováveis mecanismos pelos quais as populações de microrganismos são afetados no solo, justificando os resultados obtidos no presente trabalho.

Fig. 1. EFEITO DOS FUNGICIDAS SOBRE O NÚMERO DE FUNGOS NO SOLO

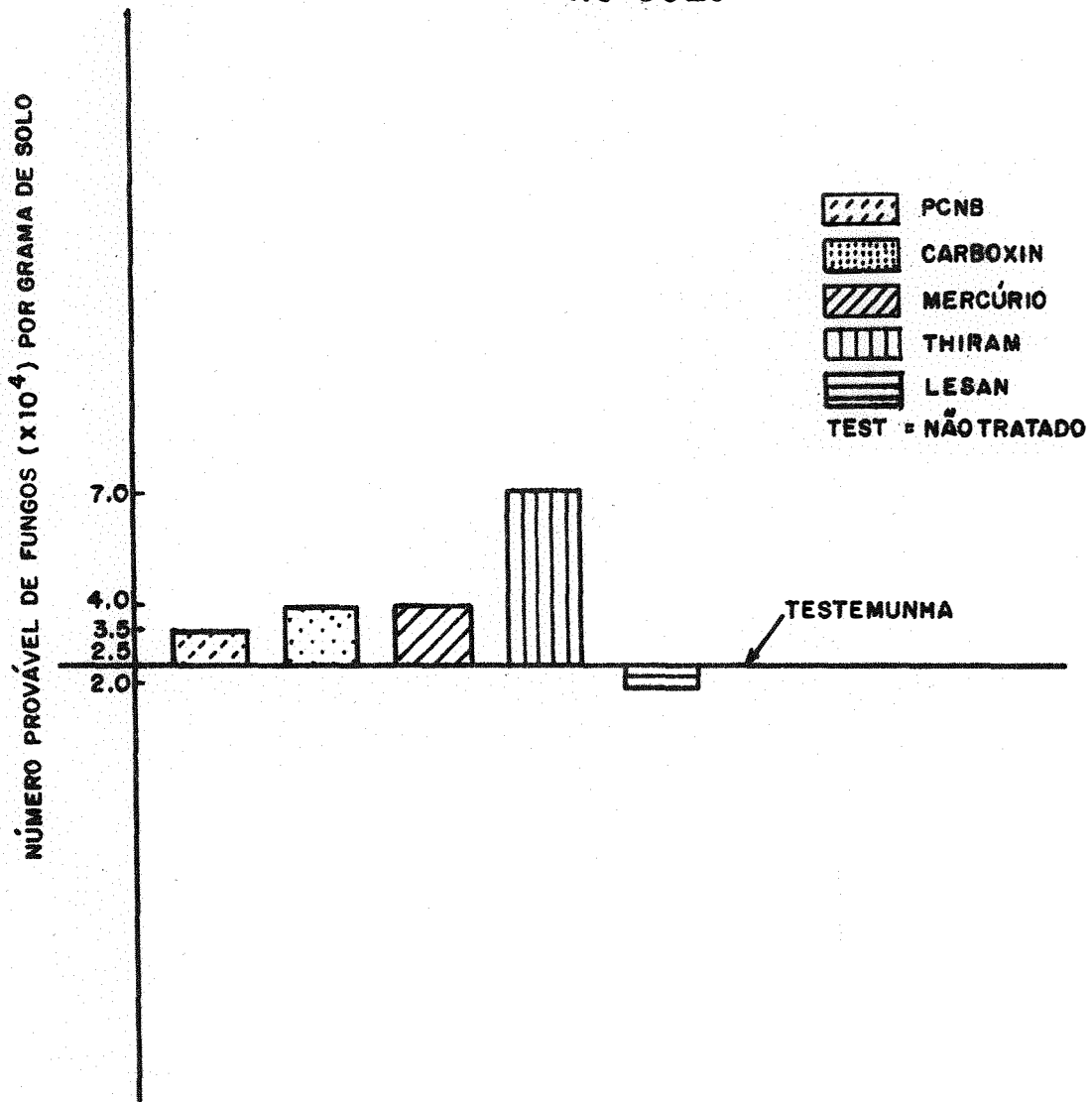




Fig. 2. EFEITO DOS FUNGICIDAS SOBRE O NÚMERO DE ACTINOMYCETES NO SOLO

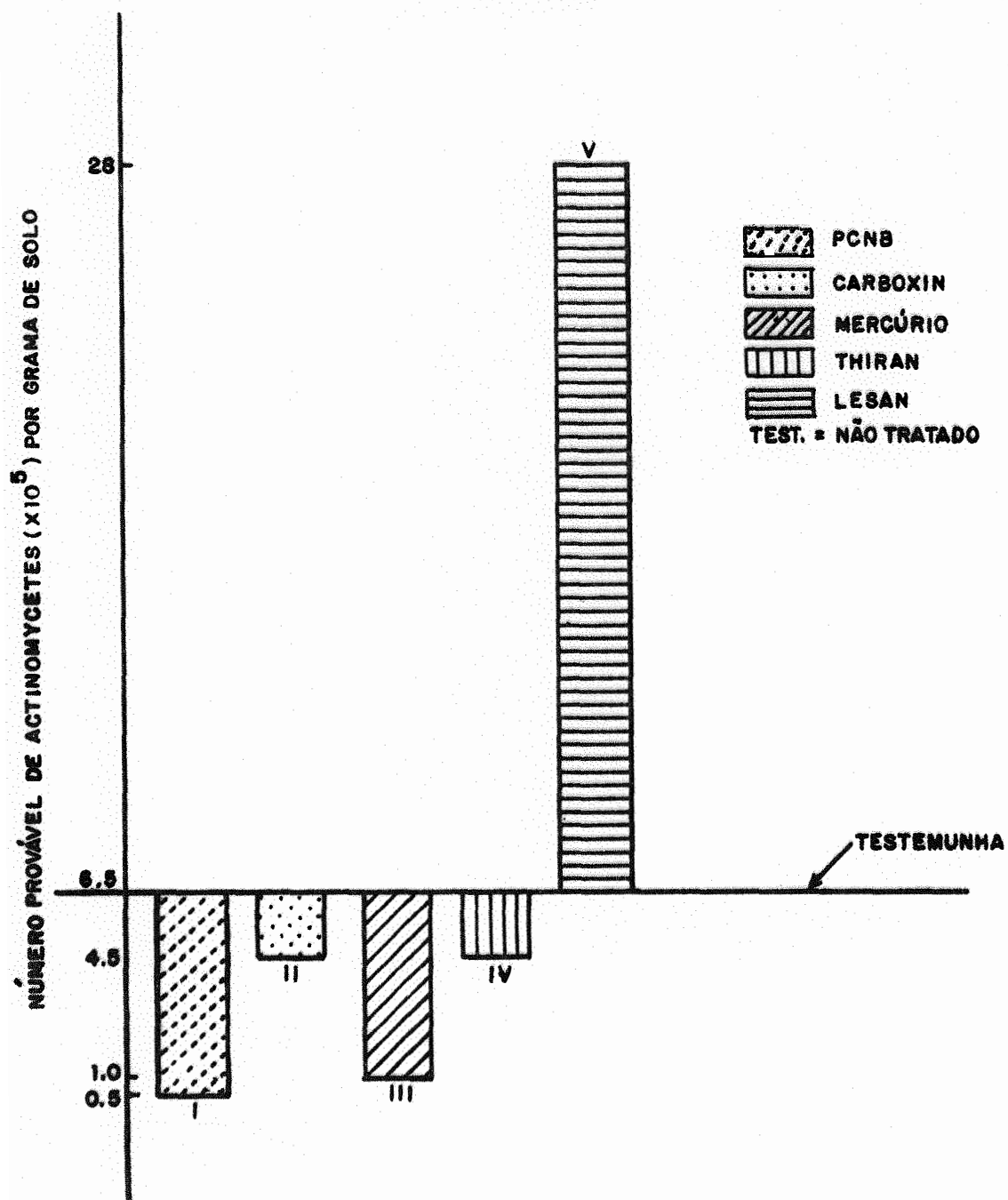


Fig. 3. EFEITO DOS FUNGICIDAS SOBRE O NÚMERO DE BACTÉRIAS NO SOLO

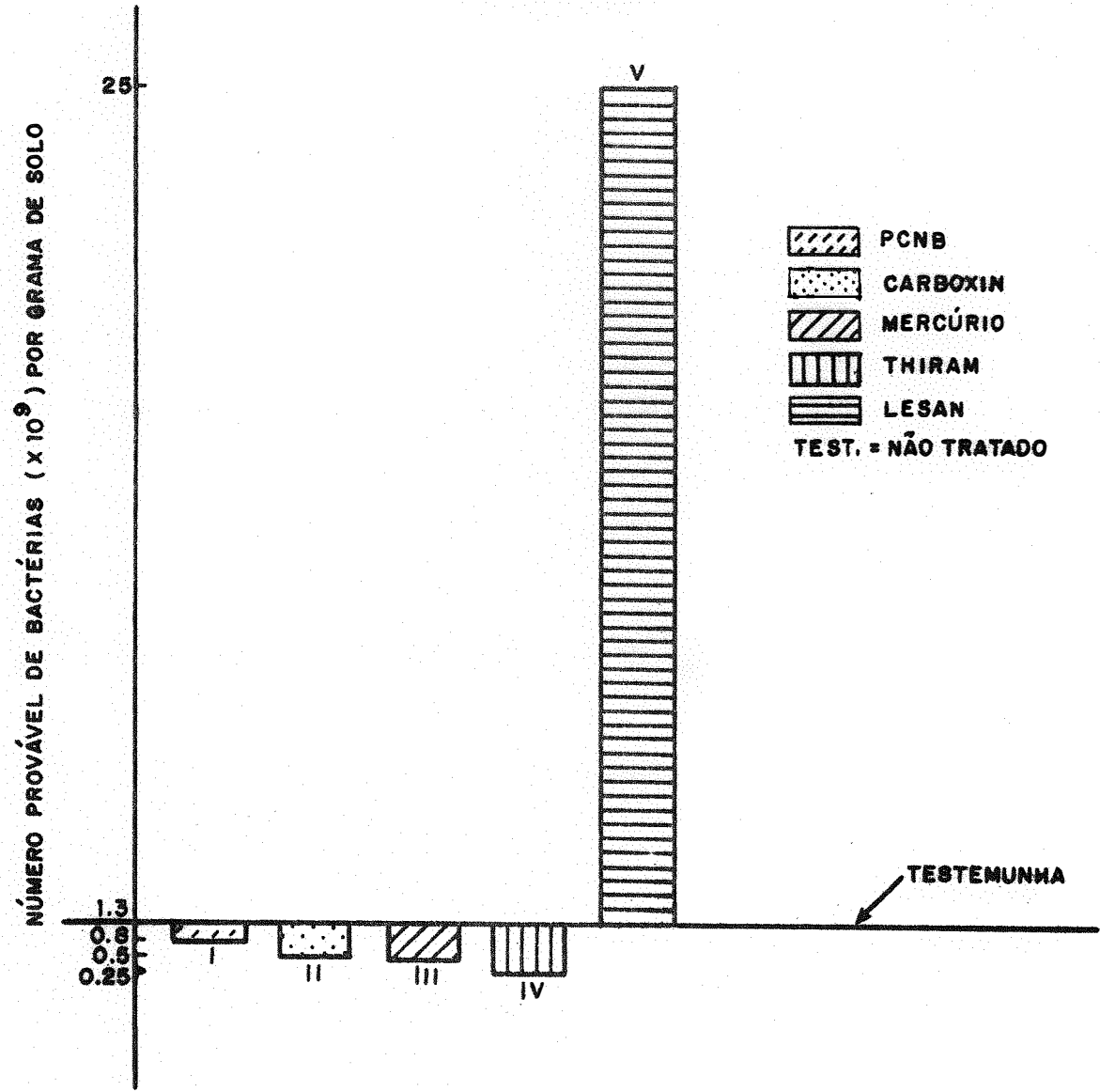


Fig. 4. EFEITO DOS FUNGICIDAS SOBRE OS ORGANISMOS PROTEOLÍTICOS

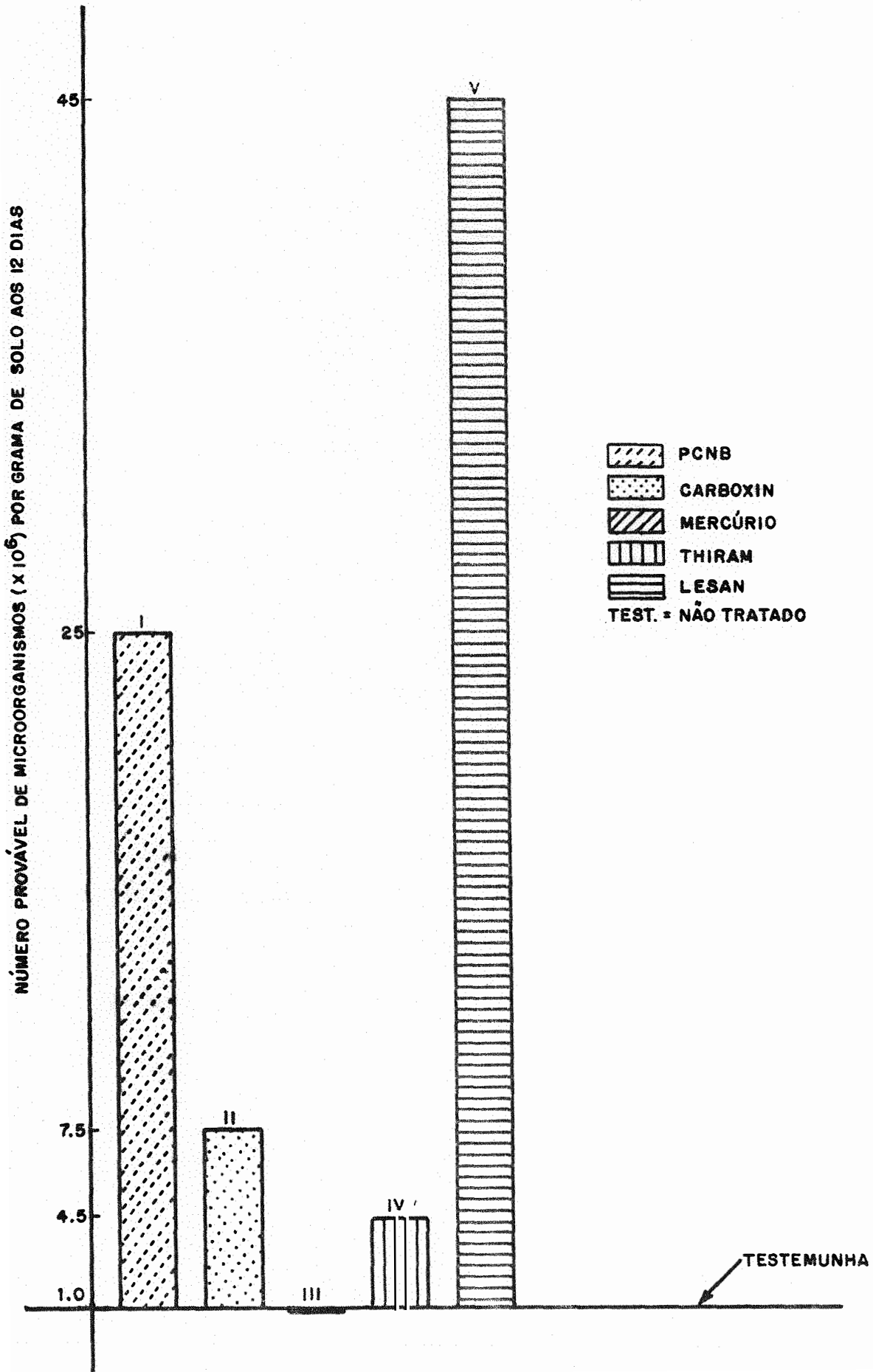


Fig. 5. EFEITO DOS FUNGICIDAS SOBRE OS ORGANISMOS AMONIFICANTES NO SOLO

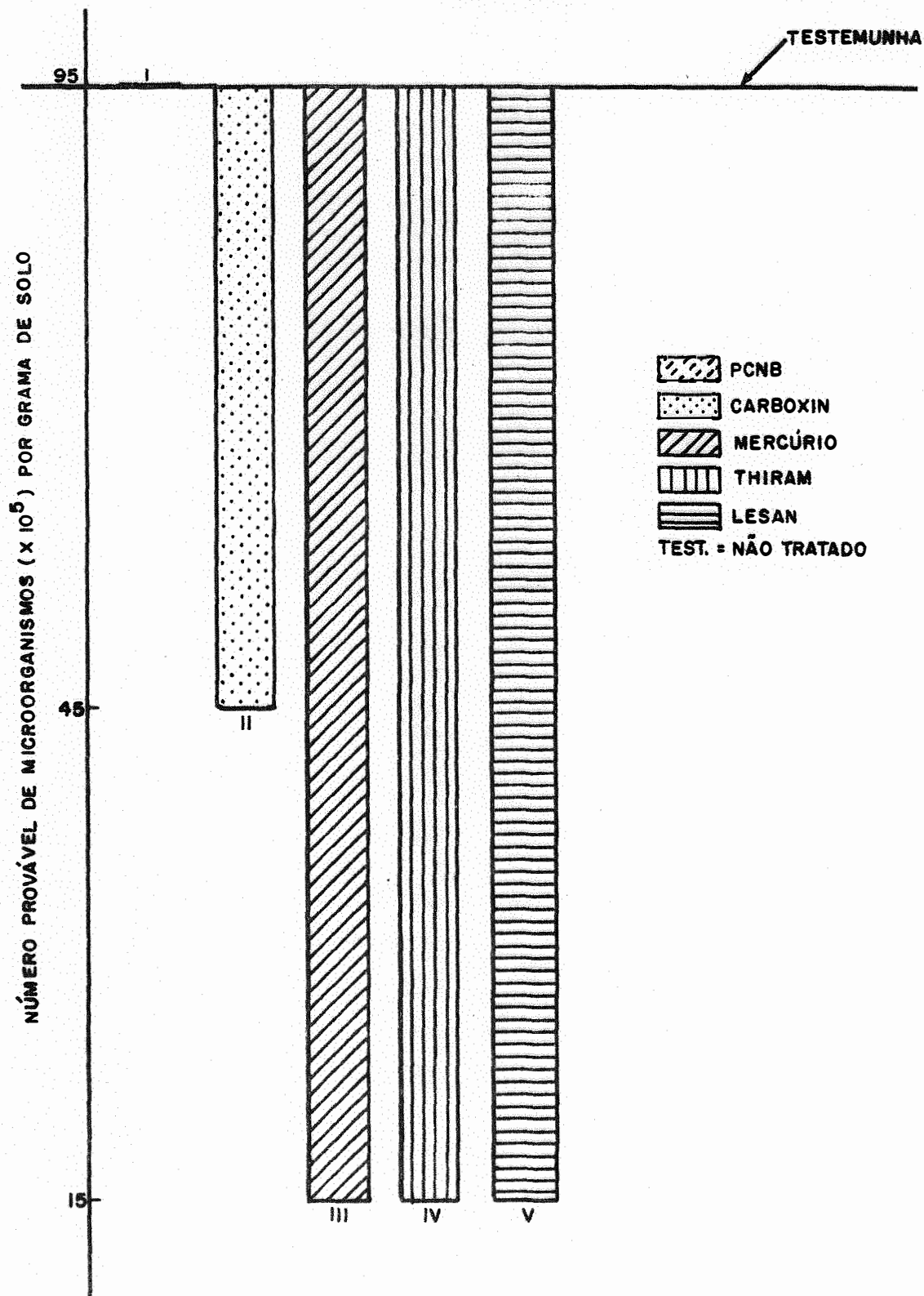


Fig. 6. EFEITO DOS FUNGICIDAS SOBRE OS ORGANISMOS NITROSANTES NO SOLO

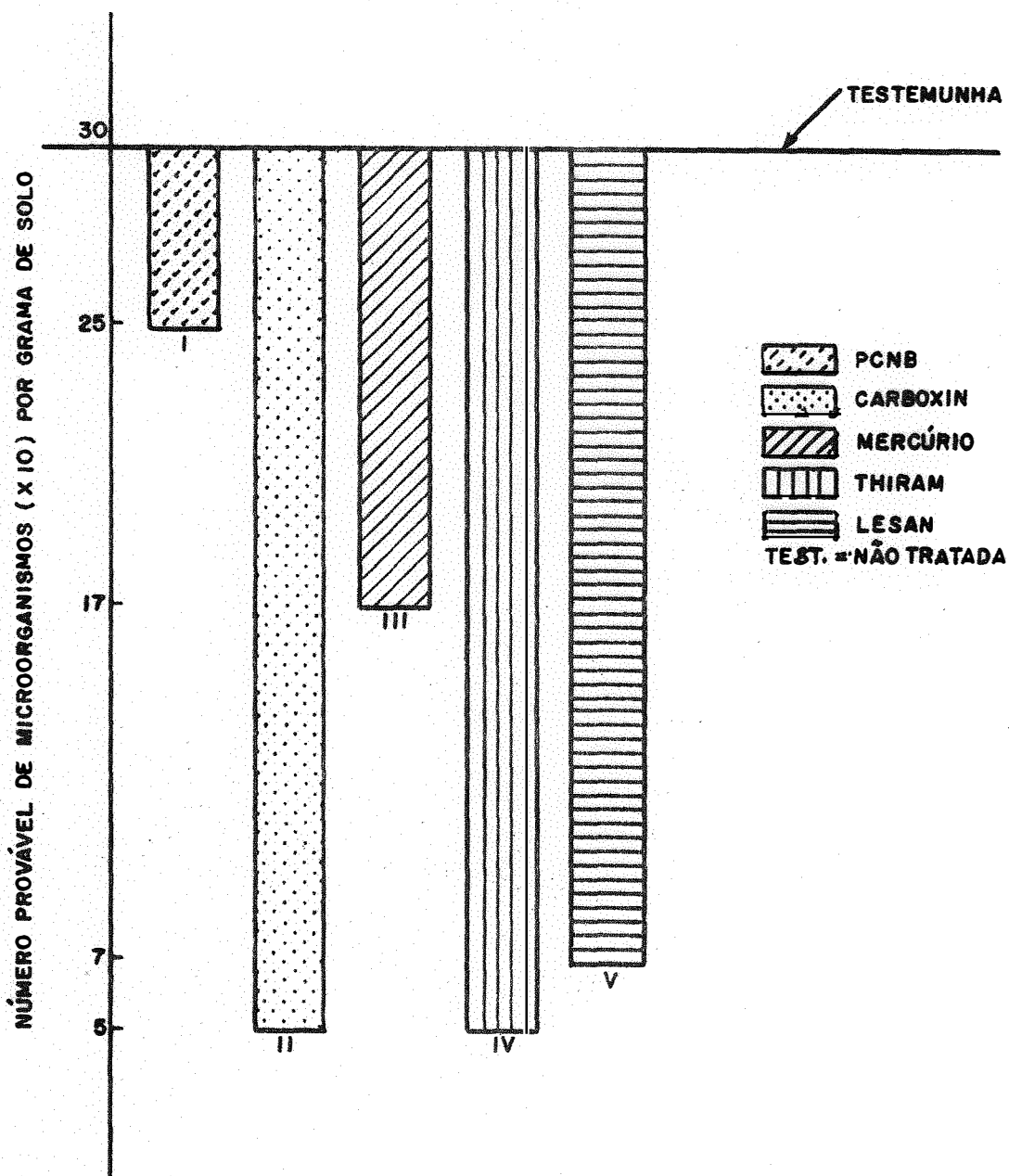


Fig. 7. EFEITO DOS FUNGICIDAS SOBRE OS ORGANISMOS NITRATANTES

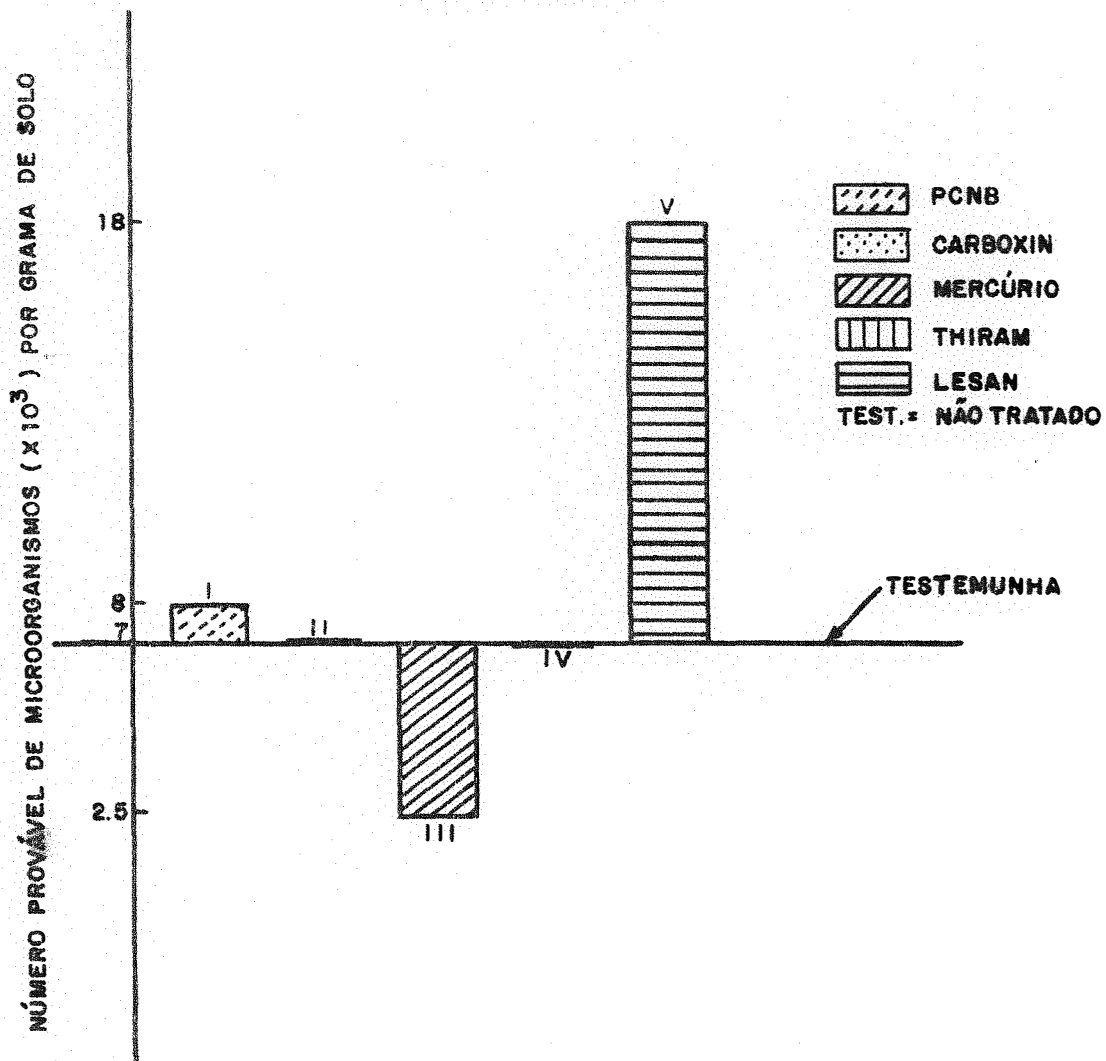


Fig. 8. EFEITO DOS FUNGICIDAS SOBRE A FIXAÇÃO AERÓBIA NO SOLO

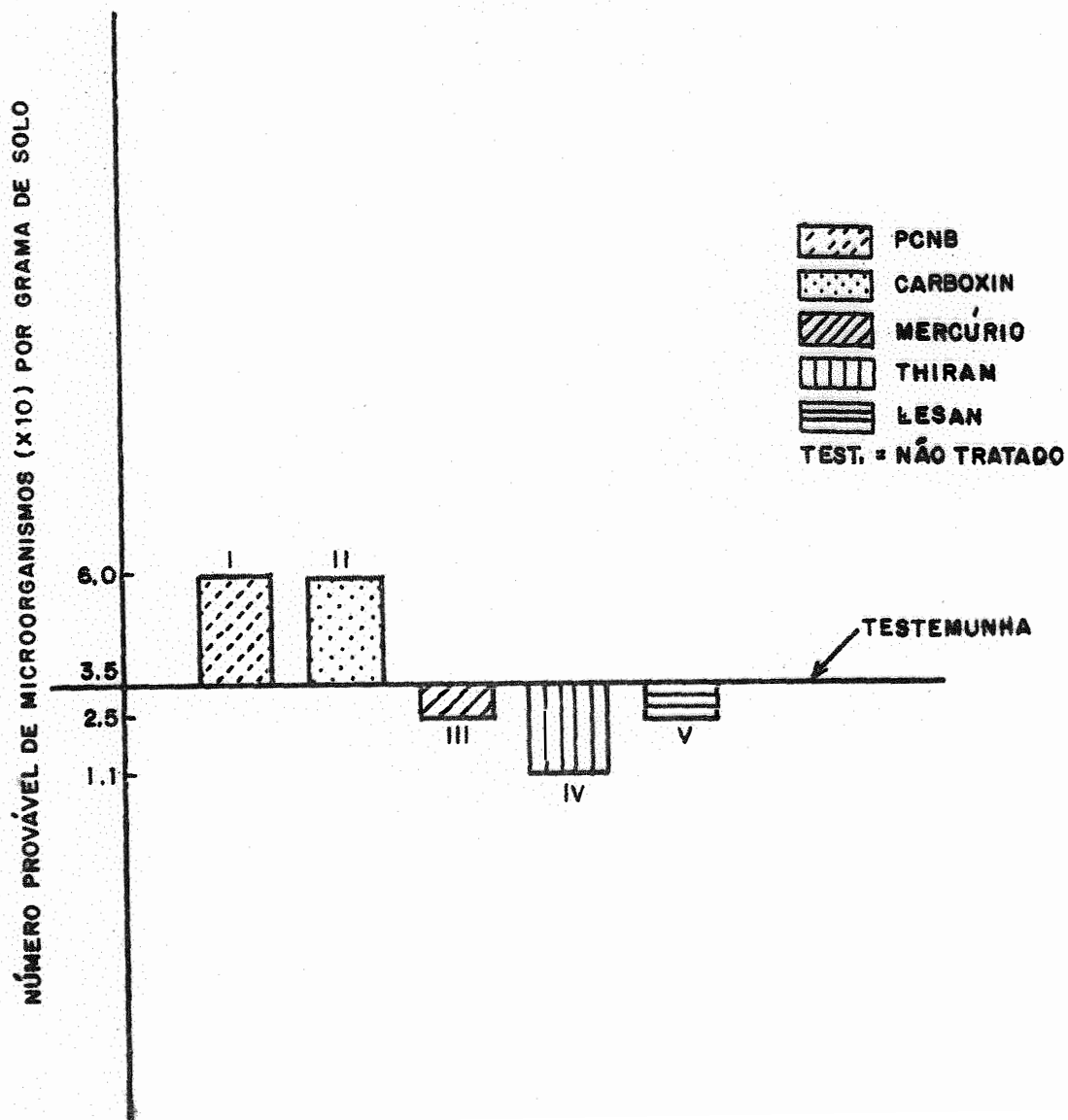


Fig. 9. EFEITO DOS FUNGICIDAS SOBRE A FIXAÇÃO ANAERÓBIA NO SOLO

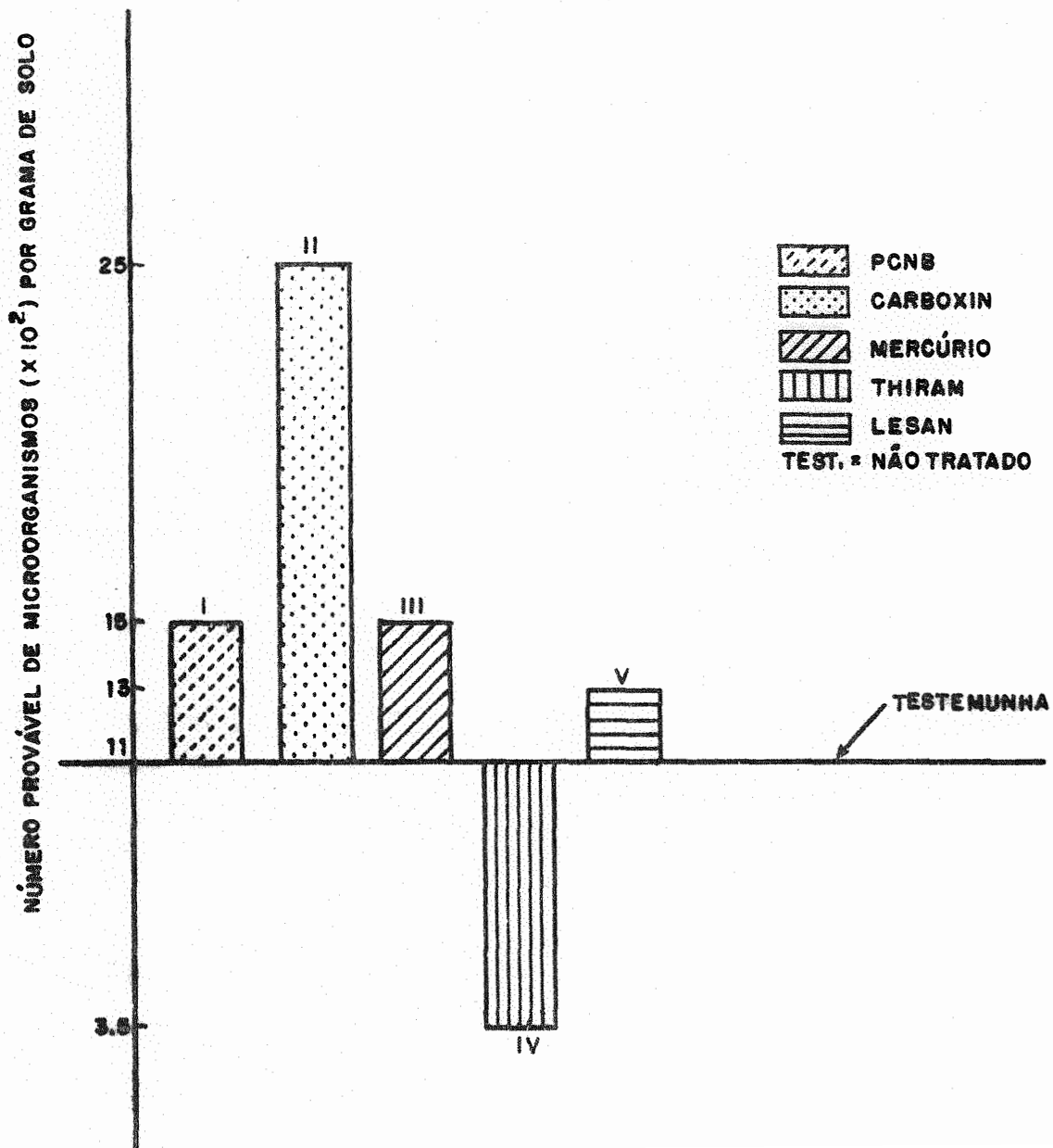
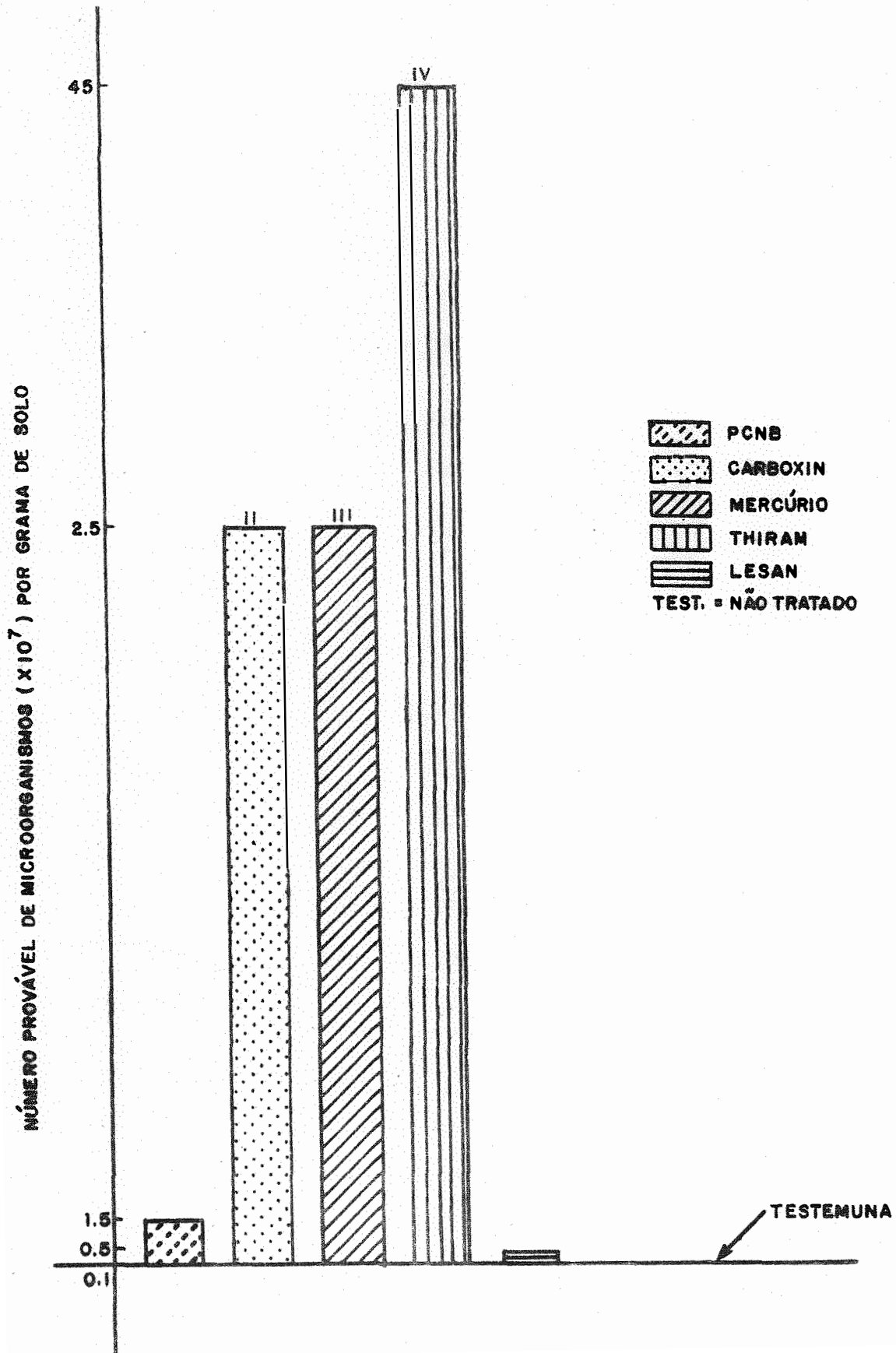




Fig. 10. EFEITO DOS FUNGICIDAS SOBRE OS ORGANISMOS DESNITRIFICANTES



## 6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, nas condições do presente trabalho, podem ser tiradas as seguintes conclusões:

- O tratamento de sementes, com fungicidas específicos, é um método eficiente para o controle do "damping-off". O fungicida Lesan mostrou ser eficiente para o controle de Pythium aphanidermatum, causador de "damping-off" em tomateiro.

- A maioria dos fungicidas utilizados pode provocar alterações nas populações de microrganismos do solo, afetando, desfavoravelmente, grupos fisiológicos que atuam em processos de elevado interesse agrônômico, tais como a Amonificação e a Desnitrificação.

Esses fenômenos causam prejuízos que vão aumentando progressivamente com a intensificação do uso daqueles produtos.

## 7. SUMMARY

Isolation of Pythium aphanidermatum (EDSON) Fitz., from soil was made, using seeds of Cannabis sativa L. as a bait. Oospore production techniques were utilized, treating fungi mycelia, cultivated in media V-8 Agar + Cholesterol, with unsterile soil extract, to give more uniformity to inoculum and more precise inoculation method. Chemical control of pre emergence damping-off of tomato, caused by P. aphanidermatum was studied by treating seeds with PCNB, Carboxin, Thiran, Lesan and Mercuric fungicides. The three treatment methods: dry, pellet and umid were employed.

These experiments were conducted in greenhouse, using unsterile soil inside clay spot 27 x 27 x 10 cm. The treated seeds were inoculated after planting with a  $6 \times 10^4$  oospore/ml solution.

Finally, was studied the chemical control effect against the population and physiological groups of soil microorganisms, moreover those which has active participation in proteolysis, aerobic and anaerobic fixations, ammonification, nitrification and denitrification process.

## 7. LITERATURA CITADA

- AGNIHOTRI, V.P.; O. VAARTAJA, 1967. Effects of amendments, soil moisture contents, and temperatures on germination of Pythium sporangia under the influence of soil mycostasis. *Phytopathology* 57:1116-1120
- AGNIHOTRI, V.P.; S. KISHAN e T.R. BUDHRAJA, 1974. Persistence and degradation of Vitavax in soil and sugarcane setts and its effect on soil fungi. *Biol. Sci.* 39:561-568.
- AHMADINEJAD, A., 1974. Seedling diseases of sugar beet in Iran and the effects of some fungicides on the causal agents. *Iran J. Plant Pathol.* 9:50-52 (Abst.).
- AYERS, W.A. e R.D. LUMSDEN, 1975. Factors affecting production and germination of oospores of three Pythium species. *Phytopathology* 65:1094-1100.
- BARTON, R., 1961. Saprophytic activity of Pythium mammilatum to pioneer colonization of substrates. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 44:105-118.
- BIRD, L.S., 1964. The influence of in-covering soil fungicides on the covering soil microflora in relation to cotton seedling diseases occurrence. *Phytopathology* 54:621 (Abst.)
- BURR, T.J. e M.E. STANGUELLINI, 1973. Propagule nature and density of Pythium aphanidermatum in field soil. *Phytopathology*, 63:1499-1501.

- CAMPBELL, W.A. e F.F. HENDRIX, 1973. Feeder root system diseases. The plant root and its environment. Ed. E.W. CARSON.
- CARDOSO, C.O.N.; E.J.B.N. CARDOSO; A.C.D. DE TOLEDO; H. KIMATI e J. SOAVE, 1976. Guia de Fungicidas. Ed. Summa Phytopathologica. Piracicaba, 209 pp.
- CARVALHO, P.C.T., 1965. Ocorrência no Brasil de algumas espécies de Pythium de interesse à Olericultura. Rickia 2:89-106.
- COLE, A.W. e W.E. BATSON, 1975. Effects of diphenamid on Rhizoctonia solani, P. aphanidermatum and "damping-off" of tomato. Phytopathology 65:431-434.
- CRAM, W.H. e O. VAARTAJA, 1957. Rate and timing of fungicidal soil treatments. Phytopathology 58:714-715.
- DUBEY, H.E.; R.L. RODRIGUEZ, 1970. Effect of Dyrene and Maneb on Nitri-  
fication and Ammonification, and their degradation on tropical soils. Soil Science Soc. Amer. Proc. 34:435-439.
- FARLEY, J.D. e J.L. LOCKWOOD, 1968. The supression of actinomycetes by PCNB in culture media used for enumerating soil bacteria. Phytopathology 58:714-715.
- FLENTJE, N.T. e H.K. SAKSENA, 1964. Pre-emergence rooting of peas in South Australia. III. Host-pathogen interaction. Australian J.Biol. Sci. 17:665-675 (Abst.)
- GARDNER, D.E. e F.F. HENDRIX, Jr., 1973. Carbon dioxide and oxigen concentration in relation to survivals and saprophytic growth of Pythium irregulare and P. vexans in soil. Can. J. Bot. 51:1593-1598.
- GARRET, S.D., 1970. Pathogenic root-infecting fungi. Cambridge University Press. London 294 pp.
- GAUMAN, E., 1950. Principles of plant infection. Hafner Publishing Company, New York 543 pp.
- GILMAN, J.C., 1963. Manual de los hongos del suelo. Trad. Fuentes, S. 1ª Ed. Espanhola 1963. Cia. Ed. Continental, México, 572 pp.
- GIRARD, H. e R. ROGIEUX, 1964. Técnicas de Microbiologia Agrícola. Editorial Acribia. Zaragoza. Espanha. 267 pp.

- GRIFFIN, D.M., 1963. Soil physical factors and the ecology of fungi. II. Behaviour of Pythium ultimum at small soil-water suction. Trans. Brit. Mycol. Soc. 46:368-372.
- HENDRIX, F.F. Jr. e W.A. CAMPBELL, 1973. Pythiums as plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 10:77-98.
- HILLS, F.J. e L.D. LEACH, 1962. Photochemical decomposition and biological activity of dimethylamino-benzene-diazo-sodium sulfonate (DEXON). Phytopathology 52:51-56.
- HOCH, H.C. e D.J. HAGEDORN, 1974. Studies on chemical control of bean root and hypocotyl rot in Wisconsin. Plant Disease Reporter 58:941-944.
- HOUSEWORTH, L.D. e B.G. TWEEDY, 1973. Effect of atrazine in combination with Captan or Thiram upon fungal and bacterial populations in the soil. Plant and Soil 38:493-500.
- JACKSON, R.M., 1958. An investigation of fungistasis in Nigerian Soils. J. Gen. Microbiol. 18:248-258.
- KARANTH, N.G.K.; C. CHITRA e V.N. VASANTHARAJAN, 1975. Behaviour of the fungicide Dexon in soil. J. Indian Inst. Sci. 56:290-301
- KRAFT, J.M.; R.M. ENDO e D.C. ERWIN, 1967. Infection of primary roots of bentgrass by zoospores of P. aphanidermatum. Phytopathology 57:86-90.
- KRAFT, J.M. e D.C. ERWIN, 1967. Stimulation of Pythium aphanidermatum by exudates from mung bean seeds. Phytopathology 57:866-868.
- KREUTZER, W.A., 1963. Selective toxicity of chemicals to soil microorganisms. Ann. Rev. Phytopathology 1:101-127.
- KRUGNER, T.L., 1971. Controle químico do "damping-off" em eucalipto. Piracicaba, ESALQ, 59 pp (Dissertação M.S.).
- LOCKWOOD, J.L., 1976. Soil Borne Plant Pathogens: Ecology, pesticides and biological control. Summa Phytopathologica 9:71-84.
- LUNA, V.L. e R.B. HINE, 1964. Factors influencing saprophytic growth of P. aphanidermatum in soil. Phytopathology 54:955-959.
- MARTINEZ, J.A.; B.P. BASTOS CRUZ e M.B. FIGUEIREDO, 1961. Experiências em estufa para controlar o tombamento em sementeira de eucalipto. Arq. Inst. Biol. 28:185-198.

- MAHMOUD, S.A.Z.; S.M. TAHA; A.M. ABDEL-HAFEZ e A.S. HAMED, 1972. Effect of some pesticides on Rhizosphere microflora of cotton plants. (Abst) Soil & Fertil. 1975, 38:567.
- MATTHEWS, U.D., 1931. Studies on the genus Pythium. University of N. C. Press. Chapel Hill. 136 pp.
- MCKEEN, C.D., 1954. Methyl bromide as a soil fumigant for controlling soil-borne pathogens and certain other organisms in vegetable seed beds. Can. J. Bot. 32:101-115.
- MIRCETICH, S.M. e H.W. FOGUE, 1969. Role of Pythium in "damping-off" of peach. Phytopathology 59:356-358.
- MIDDLETON, J.T., 1943. The taxonomy, host range and geographic distribution of the genus Pythium. Mem. Torrey Bot. Club 20:1-171.
- MUNNECKE, D.E., 1958. A biological assay of nonvolatile difusible fungicides in soil. Phytopathology 48:581-585.
- MURTHY, N.B.K. e K. RAGHU, 1976. Effect of Thiram on plant growth and rhizosphere microflora of barley and nodulation in-cowpea. Plant and Soil 44:491-493.
- NATTI, J.J., 1966. Evaluation of seed treatments with PCNB for the control of damping-off of table beet seedlings. Plant Disease Reporter Vol. 50:614-617.
- OVERMAN, A.J. e D.S. BURGIS, 1956. Allyl alcohol as a soil fungicide. Phytopathology 46:523-535.
- RAM REDDY, M.A.; G.A. SALT e F.T. LAST, 1964. Growth of Picea sitchensis in old forest nurseries. Ann. Appl. Biol. 54:397-414.
- RICHARDSON, L.T., 1954. The persistence of Thiram in soil and its relationship to the microbial balance and damping-off control. Can. J. Bot. 32:335-346.
- RONCADORI, R.W. e S.M. McCARTER, 1972. Effect of soil treatment, soil temperature and plantage on Pythium root rot of cotton. Phytopathology 62:373-376.
- ROTH, L.F. e A.J. RIKER, 1943. Influence of temperature, moisture and soil reaction on the damping-off of red pine seedlings caused by Pythium and Rhizoctonia. J. Agr. Res. 67:273-293.

- SCHREIBER, L.R. e R.J. GREEN, 1963. Effect of root exudates on germination of conidia and microsclerotia of Verticillium albo-atrum inhibited by the soil fungistasis principle. *Phytopathology* 53:260-264.
- SCHROTH, M.N. e W.C. SNYDER, 1961. Effect of host exudates on chlamydospore germination of the bean root rot fungus Fusarium solani f. phaseoli. *Phytopathology* 51:389-393.
- SETLIFF, E.C. e D. HOCKING, 1968. Studies on damping-off in East African pine nurseries. *PANS* 14:36-41.
- SPARROW, F.K. Jr., 1960. Aquatic Phycomycetes. The University of Michigan Press. 1187 pp.
- STANGHELLINI, M.E. e J.G. HANCOCK, 1971. The sporangium of Pythium ultimum as a survival structure in soil. *Phytopathology* 61:157-164.
- STANGHELLINI, M.E. e T.J. BURR, 1973. Germination in vivo of P. aphanidermatum oospores and sporangia. *Phytopathology* 63:1493-1496.
- STANGHELLINI, M.E. e T.J. BURR, 1973. Effect of soil water potential on disease incidence and oospore germination of P. aphanidermatum. *Phytopathology* 63:1493-1496.
- STANGHELLINI, M.E., 1974. Spore germination growth and survival of Pythium in soil. *Proceedings of the American Phytopathological Society*. 1:215-223.
- VAARTAJA, O., 1956. Screening fungicides for controlling damping-off of tree seedlings. *Phytopathology* 46:387-390.
- VAARTAJA, O., 1964. Chemical treatment of seedbeds to control nursery diseases. *Botanical Review* 30:1-91.
- VAARTAJA, O. e M. BUMBIERIS, 1964. Abundance of Pythium species in nursery soils in South Australia. *Aust. Biol. Sci.* 17:436-445. (Abstr.).
- WARCUP, J.H., 1963. Growth and reproduction of soil microorganisms in relation to substrate. In BAKER e SNYDER (ed.) 52-68. *Ecology of Soil Borne Plant Pathogens*. University of California Press.
- YALE, J.W. e E.K. VAUGHAN, 1962. Effects of mineral fertilizers on damping-off of table beets. *Phytopathology* 52:1286-1287.



A P Ê N D I C E

Tabela 1. Comparação entre médias do número de plantas vivas 15 dias após a inoculação \*

| Tratamentos** | Bloco I | Bloco II | Bloco III | $\Sigma$ | $\bar{X}$ |
|---------------|---------|----------|-----------|----------|-----------|
| PCNB-S        | 14      | 15       | 16        | 45       | 15,00 f   |
| PCNB-P        | 20      | 20       | 18        | 58       | 19,33 de  |
| PCNB-U        | 17      | 17       | 18        | 50       | 16,66 ef  |
| Thiram-S      | 18      | 21       | 19        | 58       | 19,33 de  |
| Thiram-P      | 28      | 26       | 25        | 79       | 26,33 c   |
| Thiram-U      | 26      | 27       | 29        | 82       | 27,33 c   |
| Mercurial-S   | 20      | 19       | 18        | 57       | 19,00 de  |
| Mercurial-P   | 12      | 15       | 14        | 41       | 13,66 g   |
| Mercurial-U   | 18      | 20       | 21        | 59       | 19,66 d   |
| Carboxin-S    | 29      | 27       | 29        | 85       | 28,33 c   |
| Carboxin-P    | 28      | 26       | 28        | 82       | 27,33 c   |
| Carboxin-U    | 26      | 27       | 24        | 77       | 25,66 c   |
| Lesan-S       | 36      | 35       | 34        | 105      | 35,00 a   |
| Lesan-P       | 32      | 31       | 30        | 93       | 31,00 b   |
| Lesan-U       | 27      | 26       | 28        | 81       | 27,00 c   |
| Testemunha-I  | 3       | 2        | 4         | 9        | 3,00 h    |
| Testemunha-II | 34      | 36       | 35        | 105      | 35,00 a   |

\* Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente.

\*\* S = via seca

P = "pellet"

U = via úmida.

Tabela 2. Análise da variância

| Fonte de Variação | GL | SQ       | QM      | F       |
|-------------------|----|----------|---------|---------|
| Tratamento        | 16 | 3.291,37 | 179,938 | 114,029 |
| Repetição         | 2  | 0,1576   | 0,07882 | 0,05    |
| Resíduo           | 32 | 50,51    | 1,578   |         |
| Total             | 50 | 3.342,04 |         |         |

CV = 5,49

DMS = 2,69

Tuckey - 5% = 3,71

1% = 4,35

Tabela 3. Comparação entre as alturas médias de plantas (cm) provenientes de sementes tratadas com fungicidas 15 dias após a germinação \*

| Tratamento | Bloco I | Bloco II | Bloco III | $\Sigma$ | X       |
|------------|---------|----------|-----------|----------|---------|
| 1          | 8,25    | 7,51     | 8,06      | 23,82    | 7,94 g  |
| 2          | 8,09    | 8,52     | 9,08      | 25,69    | 8,56 e  |
| 3          | 8,03    | 8,07     | 7,50      | 23,60    | 7,87 gh |
| 4          | 9,04    | 8,56     | 8,52      | 26,12    | 8,71 d  |
| 5          | 6,82    | 5,93     | 6,81      | 19,56    | 6,52 j  |
| 6          | 9,80    | 10,02    | 9,08      | 28,90    | 9,63 b  |
| 7          | 8,06    | 8,01     | 7,58      | 23,65    | 7,88 gh |
| 8          | 7,54    | 8,80     | 8,09      | 24,43    | 8,14 f  |
| 9          | 8,00    | 7,92     | 8,02      | 23,94    | 7,98 fg |
| 10         | 8,91    | 8,94     | 8,90      | 26,75    | 8,92 c  |
| 11         | 5,52    | 4,93     | 5,07      | 15,52    | 5,17 n  |
| 12         | 8,08    | 8,03     | 9,01      | 25,12    | 8,37 e  |
| 13         | 7,54    | 7,58     | 8,04      | 23,16    | 7,72 h  |
| 14         | 5,52    | 6,09     | 6,03      | 17,64    | 5,88 l  |
| 15         | 7,05    | 8,01     | 7,05      | 22,11    | 7,37 i  |
| 16         | 5,00    | 6,03     | 6,02      | 17,05    | 5,68 m  |
| 17         | 10,00   | 11,05    | 10,06     | 31,11    | 10,37 a |

\* Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente.

Tabela 4. Análise da variância

| Fonte de Variação | GL | SQ     | QM    | F         |
|-------------------|----|--------|-------|-----------|
| Tratamento        | 16 | 90,067 | 5,629 | 29,807    |
| Repetição         | 2  | 0,225  | 0,113 | 0,598n.s. |
| Resíduo           | 32 | 6,043  | 0,189 |           |
| Total             | 50 | 96,335 |       |           |

CV = 5,51%

DMS = 0,188

Tuckey = 5% = 1,304

1% = 1,532