

ERRADICAÇÃO DE *Fusarium oxysporum* EM SEMENTES DE ALFAFA UTILIZANDO TERMO E QUIMIOTERAPIA

MARTA. A. S. MENDES¹, PAULA M. M. P. LIMA*, JOSÉ N. L. FONSECA¹ & MARIA F. SANTOS*

¹Laboratório de Quarentena Vegetal, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Cx. Postal 02372, CEP 70770-900 Brasília, DF, fax: (061) 448-4627, e-mail: martamen@cenargen.embrapa.br

(Aceito para publicação em 11/04/2001)

Autor para correspondência: Marta A. S. Mendes

MENDES, M.A.S., LIMA, P.M.M.P., FONSECA, J.N.L. & SANTOS, M.F. Erradicação de *Fusarium oxysporum* em sementes de alfafa utilizando termo e quimioterapia. Fitopatologia Brasileira 26:148-152. 2001.

RESUMO

Sementes de alfafa (*Medicago sativa*) contaminadas *in vitro* com *Fusarium oxysporum* foram submetidas a tratamento térmico seco, térmico úmido e químico, visando a erradicação deste patógeno. O tratamento térmico seco foi realizado em câmara com fluxo de ar constante, em sementes com umidade relativa abaixo de 5%, pré-tratamento a 60 °C por 3 ou 6 h, seguido do tratamento a 90 °C por 3 ou 6 h. O tratamento térmico úmido foi realizado em banho-maria, com pré-tratamento a 40 °C por 10, 20 ou 30 min e tratamentos a 50 °C ou 60 °C por 10, 20 e 30 min. Os produtos químicos testados foram benomyl, thiabendazole, iprodione e thiram, nas dosagens recomendadas pelos fabricantes e o triplo dessas dosagens. Foram avaliados os

efeitos dos tratamentos no controle de *F. oxysporum*, pelo método de "Blotter test", e na germinação das sementes. O tratamento térmico úmido, 40 °C por 20 min, seguido de 50 °C por 20 min, erradicou o patógeno *F. oxysporum*, mas reduziu significativamente a germinação das sementes. O tratamento térmico seco a 60 °C por 3 h, seguido de 90 °C por 3 ou 6 h de exposição, erradicou *F. oxysporum* sem alterar significativamente a germinação das sementes. Benomyl foi o mais eficiente dos produtos químicos testados, erradicando *F. oxysporum* sem afetar a germinação das sementes de alfafa.

Palavras-chave: tratamento térmico seco, tratamento térmico úmido, tratamento químico, fungo, semente.

ABSTRACT

Eradication of *Fusarium oxysporum* in alfalfa seeds by thermal and chemical treatments

The dry thermal treatment was conducted in a continuous air flux chamber on alfalfa (*Medicago sativa*) seeds with relative humidity under 5%. Seeds underwent a pre-treatment for 60 °C during three or six hours, followed by a treatment at 90 °C for three or six hours. The wet treatment was conducted in water bath, and consisted of a pre-treatment at 40 °C for 10, 20 or 30 min, and then treatments at 50 °C or 60 °C for 10, 20 or 30 min. The chemicals tested were benomyl, thiabendazole, iprodione and thiram, at the dosages recommended by their manufactures

and also at three times these dosages. The wet thermal treatment at 40 °C for 20 min, followed by the treatment at 50 °C for 20 min, were effective in the eradication of *Fusarium oxysporum*, but significantly affected the alfalfa seed germination. The dry thermal treatment at 60 °C for 3 h, followed by the treatment of 90 °C for 3 to 6 h, eradicated *F. oxysporum* without a significant reduction in seed germination. Benomyl was the most efficient chemical product in eradicating *F. oxysporum* without affecting the alfalfa seed germination.

INTRODUÇÃO

Em alfafa (*Medicago sativa* L.), o fungo *Fusarium oxysporum* Schlecht., transmitido por sementes, tem sido relatado como um dos principais agentes da podridão radicular, doença que reduz significativamente a produtividade dessa planta (Ellankaya *et al.*, 1995). Segundo Orlietz-Luthardt (1998), os isolados de *F. oxysporum* que causam

murcha, obtidos de sementes, apresentam virulência maior do que os isolados obtidos de hastes de plantas doentes.

O controle de fungos transmitidos por sementes é necessário principalmente para se evitar a transmissão de patógenos a longas distâncias e também para melhorar a qualidade do material utilizado para propagação na mesma região. O emprego de agroquímicos tem sido a forma mais comum utilizada no controle de doenças, porém verificam-se algumas desvantagens, principalmente por contaminar o meio ambiente com resíduos tóxicos não biodegradáveis e pela resistência

* Bolsista da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia

desenvolvida pelos microrganismos a esses compostos. A aplicação de agentes de controle biológico em sementes, como isolados de *Trichoderma* Pers. (Kaur & Mukhopadhyay, 1992; Reis *et al.*, 1995), uso de formulações de *Pseudomonas fluorescens* (Trevisan) Migula (Vidhyasekaran & Muthamilan, 1995) e o controle integrado através da aplicação de agentes microbianos e fungicidas reduziram a incidência de doenças causadas por *F. oxysporum* (Raju & Sivaprakasam, 1989). A aplicação de óleo essencial de algumas plantas, como *Nardostachys jatamansi* Meier & Al. em sementes inibiu o crescimento de *F. oxysporum* (Dhirendra *et al.*, 1995).

A técnica de controle de fungos transmitidos por sementes utilizando calor seco ou úmido, tem apresentado resultados promissores e foi considerada viável nos procedimentos fitossanitários de quarentena (De Leon & Grudloyma, 1994). Por meio desta terapia foram controlados e/ou erradicados diversos patógenos, entre eles *Phoma betae* Frank em sementes de beterraba (*Beta vulgaris* L.) (Bottcher & Horn, 1992), *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. em sementes de *Brassica juncea* Coss. (Randhawa & Aulakh, 1984), *Cercospora kikuchii* (Matsumoto & Tomoyasu) Gardner em sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] (Fonseca *et al.*, 1994) e *Alternaria radicina* Meier & Al. em sementes de cenoura (*Daucus carota* L.) (Pryor *et al.*, 1994). A termoterapia também reduziu consideravelmente os fungos que contaminavam superficialmente as sementes, aumentando desta forma, o seu poder germinativo (Venkatasubbaiah *et al.*, 1984; Donald & Lundquist, 1988) e vigor (Raju & Sivaprakasam, 1989).

Este trabalho teve por objetivo desenvolver uma metodologia visando erradicar *F. oxysporum* de sementes de alfafa, utilizando termo ou quimioterapia.

MATERIAL E MÉTODOS

Inoculação de sementes de alfafa com *F. oxysporum*

A partir de sementes de alfafa infetadas, foi obtido um isolado de *F. oxysporum*, sendo o mesmo cultivado em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar), sob luz fluorescente contínua, a temperatura de 28 °C, por 10 dias. Decorrido esse período o fungo foi inoculado em sementes de alfafa, utilizando-se para isso a metodologia de Garrido *et al.* (1996), com modificações, conforme descrito a seguir. As sementes de alfafa (60 g) foram colocadas em um bequer de 250 ml e imersas em suspensão de 10⁸ conídios/ml, por 15 min. Durante este tempo, as sementes foram agitadas com o auxílio de um bastão de vidro, de 3 em 3 min, para homogeneizar o inóculo. Após este procedimento as sementes foram filtradas em gaze e colocadas sobre duas folhas de papel de filtro, dentro de dessecador acoplado à bomba a vácuo (200 mmHg), que permaneceu em funcionamento por 3 h. As sementes foram mantidas no dessecador até serem submetidas aos tratamentos.

Tratamento térmico a seco das sementes inoculadas com *F. oxysporum*

As sementes de alfafa foram colocadas, previamente,

em câmara de secagem com 16 % UR (Umidade Relativa) e temperatura de 22 °C, durante 15 dias, sendo depois submetidas a um pré-tratamento térmico a 60 °C por 3 e 6 h, passando para 90 °C, sendo, nesta temperatura definidos dois tratamentos com durações de 3 e 6 h.

Os tratamentos térmicos foram realizados em estufa com fluxo de ar contínuo, marca Fanem, modelo 330, utilizando-se de uma câmara para cada temperatura. Após os tratamentos, as sementes foram submetidas a testes para avaliar o efeito sobre o controle de *F. oxysporum* e na germinação das sementes.

Deteção de *F. oxysporum* em sementes: As sementes submetidas aos tratamentos foram analisadas quanto à incidência de *F. oxysporum* pelo método de plaqueamento em papel de filtro ("Blotter Test") (ISTA, 1976), como segue: as sementes foram colocadas em caixas plásticas, tipo "gerbox", que medem 10x10x4 cm (comprimento x largura x altura), contendo duas folhas de papel de filtro umedecidas com água destilada estéril, sendo colocadas 50 sementes por "gerbox". As sementes foram incubadas por 10 dias, a 20 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 h de luz NUV (Near Ultra Violet) e 12 h escuro. Os fungos foram identificados pelas características morfológicas observadas aos microscópios estereoscópio e óptico.

Determinação do poder germinativo das sementes: Foi realizado o teste de germinação conforme prescrito nas Regras de Análises de Sementes (Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, 1992), exceto na quantidade de sementes, que foram utilizadas 200 ao invés de 400. Em cada "gerbox" foram colocadas 50 sementes que após distribuição foram incubadas em câmara com 100 % de UR, temperatura a 28 °C, sob luz fluorescente contínua. A germinação foi avaliada aos seis e 11 dias após o início do teste.

Tratamento térmico úmido das sementes inoculadas com *F. oxysporum*

Sementes de alfafa inoculadas com *F. oxysporum*, acondicionadas em sacos de tecido de "organdi", foram imersas em banho-maria com agitador, a temperatura de 40 °C, para o pré-tratamento por períodos 10, 20 e 30 min, e imediatamente transferidas para outro banho-maria regulado para 50 ou 60 °C, com agitador, para o tratamento, por períodos de 10, 20 e 30 min, e, em seguida, foram resfriadas em água a ± 22 °C. Sementes sem tratamento foram mantidas como testemunha. Após os tratamentos as sementes foram avaliadas quanto à incidência de *F. oxysporum* e germinação, conforme metodologia descrita anteriormente.

Tratamento químico em sementes de alfafa inoculadas com *F. oxysporum*

Para efeito de comparação, as sementes de alfafa inoculadas com *F. oxysporum* foram submetidas ao método convencional de tratamento químico com os produtos benomyl, thiabendazole, iprodione e thiram, nas dosagens recomendadas

pelos fabricantes e nas dosagens triplicadas recomendadas. A avaliação dos tratamentos realizou-se por meio do teste de sanidade e germinação, descritos anteriormente.

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso com quatro repetições, onde a unidade experimental constituída de um "gerbox", contendo 50 sementes cada. Procedeu-se a análise de variância (ANOVA), aplicando-se o teste F (5%) e, posteriormente, o teste Duncan (5%) para verificar o efeito dos tratamentos na incidência de *F. oxysporum* e na germinação das sementes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho não foi observado o desenvolvimento de *F. oxysporum* em sementes de alfafa, que foram submetidas ao tratamento térmico seco nas temperaturas de 60 °C (pré-tratamento) e 90 °C (tratamento), independente do tempo de exposição. Estes tratamentos também não afetaram significativamente a germinação das sementes (Tabela 1). O tratamento térmico seco (60 °C por 6 h, seguido de 3 h a 90 °C) foi relatado anteriormente controlando *C. kikuchii* em sementes de soja (Fonseca *et al.*, 1994).

O tratamento térmico úmido, com pré-tratamento a 40 °C por 10, 20 ou 30 min, seguido do tratamento a 60 °C pelo mesmo período de exposição, erradicou *F. oxysporum* das sementes de alfafa, porém reduziu significativamente a germinação das sementes. A aplicação deste tratamento apenas a 60 °C por 20 e 30 min reduziu significativamente a incidência de *F. oxysporum* sem prejudicar a germinação das sementes, sendo que no período de 20 min de exposição, a germinação foi significativamente maior do que na testemunha (Tabela 2). Estes resultados concordam com Winter *et al.* (1997) que utilizando calor úmido (52 °C por 10 min) controlou *Fusarium nivale* Ces. ex Sacc. e *Fusarium graminearum* Schwabe em sementes de cereais, com Erley *et al.* (1997) que erradicou *Fusarium moniliforme* (Sheldon) de sementes de milho (*Zea mays* L.) com a aplicação de calor úmido (57 e 60 °C por 15 min), e com Prabhu *et al.* (1982) que reduziu

TABELA 1 - Efeito do tratamento térmico seco (60 e 90 °C) na germinação e no controle de *Fusarium oxysporum* em sementes de alfafa (*Medicago sativa*)

Tempo de exposição (h) / temperaturas		Germinação (%)	Incidência de <i>Fusarium oxysporum</i> (%)
60°C	90°C		
3	3	82,0 a ¹	0,3 a
3	6	76,5 a	0,3 a
6	6	76,0 a	0,3 a
0	0	89,5 a	20 b

¹Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si em nível de 5% de significância pelo teste Duncan.

TABELA 2 - Efeito do tratamento térmico úmido (40 e 60 °C) na germinação e no controle de *Fusarium oxysporum* em sementes de alfafa (*Medicago sativa*)

Tempo de exposição (min) / temperaturas		Germinação (%)	Incidência de <i>Fusarium oxysporum</i> (%)
40°C	60°C		
0	20	76,0 a ¹	0,1 a
0	30	71,0 ab	0,1 a
10	10	37,0 c	0,1 a
10	20	29,0 d	0,1 a
10	30	14,0 f	0,1 a
20	10	21,5 e	0,1 a
20	20	11,0 gf	0,1 a
30	10	13,0 f	0,1 a
30	30	5,50 g	0,1 a
0	0	67,0 b	20 b

¹Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si em nível de 5% de significância pelo teste Duncan.

a contaminação das sementes de *Leucaena Benth* por fungos com o tratamento a 85 °C por 5 min, sem comprometer a germinação das sementes. Observa-se que o tratamento térmico úmido foi empregado para diferentes espécies de *Fusarium* e pode ser considerado uma opção para o seu controle.

Os tratamentos térmicos úmidos a 50 °C (10 e 20 min) e a 40 °C (pré-tratamento) por 10 ou 20 min, seguidos de tratamento a 50 °C pelo mesmo período, controlaram significativamente *F. oxysporum* das sementes de alfafa sem afetar significativamente a germinação das sementes. Quando se utilizou a temperatura de 50 °C no período de 30 min, os tratamentos foram eficientes na erradicação do fungo, entretanto afetaram significativamente a germinação das sementes de alfafa (Tabela 3). Winter *et al.* (1997) alcançaram resultados semelhantes, eliminando completamente *F. oxysporum* de sementes de cereais ao utilizarem calor úmido a 60 °C por 20 min, com perdas no poder germinativo, no entanto na temperatura de 56-58 °C por 20 min, o fungo foi controlado sem prejudicar a germinação.

Desta forma pode-se afirmar que, o sucesso do tratamento térmico depende do tipo de calor, seco ou úmido, da uniformidade da aplicação do calor, do período de exposição e da temperatura empregada.

Os fungicidas testados, benomyl, thiabendazole, iprodione e thiram, aumentaram a germinação das sementes de alfafa contaminadas com *F. oxysporum*, sendo que o produto benomyl aplicado nas dosagens de 50 e 150 g de i.a. por Kg de sementes e thiram aplicado na dosagem triplicada (210 g de i.a. por kg de sementes) aumentaram significativamente a germinação das sementes (Tabela 4).

Benomyl, nas duas dosagens testadas (50 e 150 g de i.a. por kg de sementes) e thiabendazole na dosagem triplicada (60 g de i.a. por kg de sementes) erradicaram o fungo das sementes de alfafa (Tabela 4). Benomyl e thiabendazole foram descritos em literatura controlando *F. oxysporum* em sementes de outras culturas (Abd Elrazik *et*

TABELA 3 - Efeito do tratamento térmico úmido (40 e 50 °C) na germinação e no controle de *Fusarium oxysporum* em sementes de alfafa (*Medicago sativa*)

Tempo de exposição (min) / temperaturas (°C)		Germinação (%)	Incidência de <i>Fusarium oxysporum</i> (%)
40°C	50°C		
0	10	62,5 a ¹	1,75 a
0	20	65,5 a	0,50 a
0	30	43,5 b	0,10 a
10	10	70,0 a	0,25 a
10	20	67,0 a	1,25 a
10	30	48,0 b	0,10 a
20	10	67,5 a	0,25 a
20	20	55,0 ab	0,10 a
20	30	40,0 b	0,10 a
0	0	65,0 a	35,50 b

¹Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si em nível de 5% de significância pelo teste Duncan.

TABELA 4 - Efeito de produtos químicos no poder germinativo e na sanidade de sementes de alfafa (*Medicago sativa*) contaminadas com *Fusarium oxysporum*

TRATAMENTO		Germinação (%)	Incidência de <i>Fusarium oxysporum</i> (%)
Produto Químico p.a.*	g. de i.a.**		
Iprodione	100	73,5 ab ¹	27,25 a
Iprodione	300	78,5 ab	17,00 b
Thiram	210	83,5 a	16,25 b
Thiram	630	76,0 ab	5,75 c
Benomyl	50	84,0 a	0,10 c
Benomyl	150	88,0 a	0,10 c
Thiabendazole	20	79,5 ab	1,50 c
Thiabendazole	60	74,5 ab	0,10 c
Testemunha		68,0 b	22,75 ab

*p.a – princípio ativo

**i.a. (ingrediente ativo) – dosagem aplicada por 100 kg de sementes.

¹Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si em nível de 5% de significância pelo teste Duncan.

al., 1990; Lee, 1984). Em solução com acetona e 0,1 % de hipoclorito de sódio, benomyl erradicou *F. oxysporum* e outros contaminantes de sementes de aspargo (*Asparagus officinalis* L.) (Elmer & Stephens, 1988). Embora estes fungicidas sejam eficientes na redução de espécies de *F. oxysporum*, alguns isolados apresentaram resistência a thiabendazole (Hanson *et al.*, 1996) e a benomyl (Santos *et al.*, 1999), demonstrando a necessidade da utilização de formas alternativas para o controle deste fungo.

Thiabendazole, na dosagem recomendada pelo fabricante e thiram, nas duas dosagens testadas, reduziram significativamente o fungo (Tabela 4). Estes resultados concordam com Gupta *et al.* (1997) que demonstraram a eficiência de thiram no controle de *F. oxysporum* em sementes de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.). Iprodione foi o único produto que não controlou significativamente *F. oxysporum* em sementes de alfafa nas duas dosagens testadas (100 e 300 g de i.a. por kg de sementes) (Tabela 4).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração de Murillo Lobo Junior, Alaíde Soares de Oliveira e de Maria de Fátima Batista pelo auxílio na realização deste trabalho

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-ELRAZIK, A.A., FAHMY, F.G., AMEIN, A.M. & EL-AMEIN, A.I. Role of onion seeds in transmission of damping-off causal fungi and chemical control of the disease. *Assiut Journal of Agricultural Sciences* 21:173-193. 1990.
- BOTTCHER, I. & HORN, G. Investigations for destroying the seed-borne black leg fungus of sugarbeet, *Phoma betae* Frank (teleomorph *Pleospora bjoerlingii* Byford), by heat treatment. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 28:39-42. 1992.
- DHIRENDRA, M., CHATURVEDI, R.V., TRIPATHI, S.C. & MISHRA, D. The fungitoxic effect of the essential oil of the herb *Nardostachys jatamansi* DC. *Tropical Agriculture* 72:48-52. 1995.
- DE LEON, C. & GRUDLOYMA, U. Heat therapy of maize seed and its effect on viability. *Indian Phytopathology* 47:1. 1994.
- DONALD, D.G.M. & LUNDQUIST, J.E. Treatment of Eucalyptus seed to maximise germination. *South African Forestry Journal* 149:9-15. 1988.
- ELLANKAYA, I.A., SOROLOVA, E.V. & KURCHENKO, I.N. Occurrence of pathogenic fungi on creeping alfafa under forest-steppe zone conditions in Ukraine. *Mikrobiologicheskii Zhurnal* 58:32-38. 1995.
- ELMER, W. H. & STEPHENS, C. P. Comparison of technique for eliminating contaminants from asparagus seeds. *Hort Science* 23:1031-1032. 1988.
- ERLEY, D.P., MYCOCK, D.J. & BERJAK, P. The elimination of *Fusarium moniliforme* Sheldon infection in maize caryopses by hot water treatments. *Seed Science and Technology* 25:485-501. 1997.
- FONSECA, J.N.L., MENDES, M.A.S., PINHEIRO, F.P. & VIDAL, A.S. Efeito da termo e quimioterapia em sementes de soja contaminadas com *Cercospora kikuchii*. *Fitopatologia brasileira* 19:297. 1994. (Resumo).
- GARRIDO, L.A., OLIVEIRA, A.S., VIDAL, A.S., MENDES, M.A.S. & FONSECA, J.N.L. Sementes de *Glycine max* infetadas artificialmente com *Phomopsis phaseoli* f. sp. *meridionalis* e *Colletotrichum truncatum*. *Fitopatologia brasileira* 21:359. 1996 (Resumo).
- GUPTA, S.K., UPADHYAY, J.P. & OJHA, K.L. Effect of fungicidal seed treatment on the incidence of chickpea wilt complex. *Annals of Plant Protection Sciences* 5(2):184-187. 1997.
- HANSON, L.E., SCHWAGER, S.J. & LORIA, R. Sensitivity to thiabendazole in *Fusarium* species associated with dry rot of potato. *Phytopathology* 86:378-384. 1996.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION

- (ISTA). Seed health testing. *Seed Science & Technology* 4:3-49. 1976.
- KAUR, N.P. & MUKHOPADHYAY, A.N. Integrated control of "chickpea wilt complex" by *Trichoderma* and chemical methods in India. *Tropical Pest Management* 38:372-375.1992.
- LEE, D.H. Fungi associated with soybean seed, their pathogenicity and seed treatment. *Korean Journal of Mycology* 12:27-33. 1984.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E REFORMA AGRÁRIA, Secretaria Nacional de Defesa Vegetal, Coordenação do Laboratório Vegetal, Programa Brasileiro de Qualidade e Produtividade, PBQP, Regras para Análise de Sementes, Brasília. 1992.
- ORLIEZ-LUTHARDT, A. On the transfer of *Fusarium* wilt by seeds in China aster. *Seed Science and Technology* 26:67-76. 1998.
- PRABHU, M.S.C., VENKATASUBBAIAH, P., SAFEEULLA, K.M., SHETTY, H.S. & SATISH-CHANDRA-PRABHU, M. Fungi associated with *Leucaena* seeds and their influence on germination. *Annals of Tropical Research* 4:151-155. 1982.
- PRYOR, B.M., DAVIS, R.M. & GILBERTSON, R.L. Detection and eradication of *Alternaria radicina* on carnot seed. *Plant Disease* 78:452-456. 1994.
- RAJU, U.J. & SIVAPRAKASAM, K. Influence of seed treatment with fungicides, bactericide, hot water and antagonists on the seedling vigour of cabbage. *Madras Agricultural Journal* 76:26-30. 1989.
- RANDHAWA, H.S. & AULAKH, K.S. Efficacy of hot water treatment to control seed-borne fungi of raya (*Brassica juncea* Com.). *Indian Journal of Plant Pathology* 4:73-76. 1984.
- REIS, A., OLIVEIRA, S.M.A. de, MENEZES, M., MARIANO, R. de L.R. & de OLIVEIRA, S.M.A. Potencial de isolados de *Trichoderma* para biocontrole da murcha de *Fusarium* do feijoeiro. *Summa Phytopathologica* 21:16-20. 1995.
- SANTOS, B.A., ZAMBOLIM, L., VENTURA, J.A. & VALE, F.X.R. Resistência de *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* ao benomyl. *Fitopatologia brasileira* 24:436-439. 1999.
- VENKATASUBBAIAH, P., PRABHU, M.S.C., SHETTY, H.S. & SAFEEULLA, K.M. Effect of hot water and chemical seed treatment on seed mycoflora in koo-babul. *Bangladesh-Journal of Botany* 13:121-129. 1984.
- VIDHYASEKARAN, P. & MUTHAMILAN, M. Development of formulations of *Pseudomonas fluorescens* for control of chickpea wilt. *Plant Disease* 79:782-786. 1995.
- WINTER, W., BANZIGER, I., KREBS, H. & RUEGGER, A. Water treatments against damping-off diseases of cereals. *Agrarforschung* 4:467-470. 1997.