

ERIC BALMER

ENGENHEIRO AGRÔNOMO - M. S.

CADEIRA DE FITOPATOLOGIA E MICROBIOLOGIA

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - U. S. P.

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DAS RELAÇÕES ENTRE

*Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum* (ATK.) SNYD.

E HANS. E *Gossypium hirsutum* L.

---

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de  
Doutor em Agronomia

PIRACICABA

1967

À minha espôsa,

dedico.

## I N D I C E

	Página
1. Introdução .....	1
2. Revisão bibliográfica .....	2
3. Material .....	5
3.1. O patógeno .....	5
3.2. O hospedeiro .....	7
4. Métodos .....	8
4.1. Meios de cultura utilizados .....	8
4.2. Solução nutritiva e condições ambientais man- tidas durante os experimentos .....	8
4.3. Técnicas de isolamento e reisolamento .....	9
4.4. Efeito da concentração do inóculo, idade das plantas e método de inoculação nos experimen- tos I e II .....	9
4.4.1. Obtenção e concentração do inóculo ...	10
4.4.2. Obtenção de plantas da variedade IAC- -RM4 com diferentes idades .....	11
4.4.3. Métodos de inoculação .....	12
4.4.4. Teste de patogenicidade .....	12
4.5. Teste de patogenicidade para isolamentos " <u>ori-         ginais</u> " de <u>Fusarium</u> , experimento III .....	13
4.6. Passagens seriadas do patógeno pelo hospedei- ro .....	13
4.6.1. Obtenção das plantas e inoculação das mesmas .....	13
4.6.2. Teste de patogenicidade, experimento IV, para os isolamentos resultantes das diferentes "pressões de seleção" .	15

	Página
4.7. Método de avaliação da severidade de doença .	15
5. Resultados .....	16
6. Discussão .....	32
7. Conclusões .....	40
8. Resumo .....	41
9. Summary .....	42
10. Bibliografia .....	43
11. Agradecimentos .....	47

## 1. INTRODUÇÃO

O algodoeiro é uma das plantas mais cultivadas no Estado de São Paulo representando portanto para muitos uma importante fonte de renda.

A murcha do algodoeiro, segundo BASTOS CRUZ (1959), já ocorria no Estado de São Paulo desde 1957 em alguns municípios paulistas chegando mais tarde a causar grandes prejuízos à lavoura algodoeira no Estado de São Paulo. Para a redução dos danos causados pela doença foram introduzidas variedades resistentes e hoje em dia a Secção de Algodão do Instituto Agrônômico de Campinas trabalha no melhoramento do algodoeiro, visando a resistência a Fusarium oxysporum f. vasinfectum (Atk.) Snyder e Hansen, que neste trabalho será referido simplesmente como Fusarium.

Com o decorrer do tempo apareceu um problema que foi a ocorrência de murcha de Fusarium em plantas de variedades resistentes. O inquiridor logo pensa na possibilidade da ocorrência da doença em plantas de variedades resistentes como sendo devido a biótipos mais patogênicos do fungo, ou mesmo devido a um processo de seleção de biótipos do patógeno pelas próprias variedades resistentes. Também era interessante saber se a resistência do material selecionado no Brasil era influenciada por fatores tais como idade das plantas, concentração do inóculo e métodos de inoculação. Foram pensamentos como estes que orientaram os trabalhos de pesquisa ora apresentados.

Os resultados apresentados neste trabalho visam esclarecer alguns pontos obscuros, embora o autor sinta que não conseguiu explorar mais do que a superfície de um problema profundo, complexo e belo.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A murcha do algodoeiro causada por Fusarium oxysporum f. vasinfectum (Atk.) Snyder e Hansen é uma doença que já foi estudada por vários pesquisadores, sendo focalizados vários aspectos da relação ambiente-patógeno e hospedeiro.

A variabilidade nas características culturais de Fusarium já foi estudada por ARMSTRONG, MAC LACHLAM e WEINDLING (1940), que relataram uma redução na quantidade do micélio aéreo e crescimento radial das culturas do fungo quando transferidas periodicamente em meio de batata-dextrose-agar. Quanto a variações na patogenicidade, os mesmos autores mencionaram que os isolamentos de Fusarium mantidos em meio de cultura por algum tempo, tiveram a sua patogenicidade reduzida quando comparadas com isolamentos recentes do mesmo fungo.

A relação patógeno-hospedeiro, estudada por ARMSTRONG e ARMSTRONG (1964), ARMSTRONG e ARMSTRONG (1948), ARMSTRONG, HAWKINS e BENNETT (1942), para o caso do Fusarium do algodoeiro não foi tão específica quando comparada à relação patógeno-hospedeiro para o caso da forma de Fusarium oxysporum que é patogênica ao tomate. ARMSTRONG e ARMSTRONG (1958) mostraram que isolamentos de Fusarium do algodoeiro diferiram em patogenicidade quando testados em hospedeiros de diferentes espécies, e atribuíram o fato a uma possível mutação que teve como consequência um aumento no número de espécies hospedeiras.

O possível efeito que o hospedeiro exerceu sobre o fungo, para o caso de Fusarium do algodoeiro, foi resumido nos dados obtidos por ARMSTRONG et al. (1940) que relataram o fato de que a patogenicidade dos isolamentos não foi signifi-

cativamente modificada após uma passagem pelo hospedeiro. CHRISTENSEN e SCHNEIDER (1948), CHRISTENSEN citado por CHRISTENSEN e DE VAY (1955) e THURSTON e EIDE (1953) chegaram a conclusões semelhantes embora tenham trabalhado com outros microrganismos. BURKHOLDER (1925), no entanto, relatou uma certa restauração na patogenicidade de Fusarium martii phaseoli. Burkholder mantido por muito tempo em meio de cultura, após duas passagens pelo hospedeiro. MILLS (1940) relatou um aumento na patogenicidade de Phytophthora infestans (Mont.) de Barry, oriúnda de batata, ao tomateiro após passagens seriadas do fungo pela folhagem do mesmo. WAGGONER e WALLIN (1952) não obtiveram, no entanto, um aumento na patogenicidade de Phytophthora infestans, ao tomateiro, quando isolamentos oriúdos da batata foram passados por fôlhas do tomateiro. THURSTON e EIDE (1953) relataram que a passagem sucessiva de uma mistura de esporângios de Phytophthora infestans, provenientes de isolamentos diferentes e inicialmente em proporções aproximadamente iguais, através da variedade Cobler, alterou a frequência dos isolamentos na mistura.

Vários pesquisadores estudaram alguns dos fatores ecológicos que influem na severidade da murcha do algodoeiro causada por Fusarium. SMITH e DICK (1960) relataram que populações elevadas de Meloidogyne incognita var. acrita mascararam os estudos da herança da resistência a Fusarium. FAHMY (1927) mencionou que o grau de capacidade infectiva dos solos variou com a quantidade de inóculo presente nos mesmos, e que os solos mais frequentemente infetados no Egito foram os solos de textura pesada, enquanto que nos Estados Unidos da América do Norte, a murcha do algodoeiro causada por Fusarium o-

correu com maior frequência em solos leves. BALMER et al. (1965) estudaram a murcha de Fusarium do algodoeiro, em uma série de experimentos em condições de casa de vegetação, relataram que no primeiro experimento a doença foi mais severa em substratos contendo alta porcentagem de areia, porém, nos experimentos seguintes, a doença ocorreu com a mesma intensidade nos substratos arenoso e argiloso. SALGADO et al., (1966) estudaram o efeito de diferentes tipos de substratos e inóculos sobre a severidade da murcha do algodoeiro, causada por Fusarium, e mostraram que a severidade da doença variou nos diferentes substratos quando o inóculo foi constituído só por Fusarium, enquanto que não foi notada diferença, entre a severidade de doença nos diferentes substratos, quando o inóculo foi constituído do fungo associado a nematóides. FAHMY (1927) relatou que as plantas suscetíveis podiam ser invadidas pelo fungo em qualquer idade **bastanda para isto que o patógeno** entrasse em contato com as raízes, porém quando a penetração se dava no estágio de seedling o dano podia ser fatal.

Em virtude das murchas causadas por diferentes formas de Fusarium oxysporum **seram doenças** que apresentam um quadro sintomatológico complexo, a severidade das mesmas foi determinada por diferentes métodos. THARP (1938) classificou a severidade da doença, em plantas de algodão, baseando-se nos sintomas das seguintes classes de plantas: plantas mortas, plantas enfezadas e com sintomas severos da doença, plantas com sintomas iniciais da murcha, plantas sem sintomas externos, porém com sintomas internos e plantas saudias. BUXTON (1956), estudando heterocariose e parassexualidade em linhagens de Fusarium oxysporum, mediu a severidade da doença ba-



seando-se na porcentagem de fôlhas da planta que mostraram sintomas. SILVEIRA et al. (1967) selecionaram plantas de algodão resistentes ao complexo Fusarium-nematóides basendo-se, para a avaliação da resistência, no número de plantas sadias existentes em cada progênie.

ARMSTRONG et al. (1940) e BURKHOLDER (1925) relataram que isolamentos de Fusarium cultivados em meio de cultura por períodos longos apresentaram menor grau de patogenicidade quando comparados a isolamentos recentes. MC KEEN e WENSLEY (1961) idealizaram a preservação das culturas de Fusarium em solo estéril. O método se mostrou de grande utilidade, pois a patogenicidade dos isolamentos por êles testados foi mantida por muitos anos. O mesmo método foi adotado pelo autor do presente trabalho, com bastante sucesso.

### 3. MATERIAL

#### 3.1. O patógeno

Dos muitos isolamentos de Fusarium feitos durante o período compreendido entre 1963 e 1966, vinte e dois dêles foram selecionados para os estudos relatados neste trabalho. A seleção dos isolamentos foi baseada nos locais de origem, variedades das quais foram isolados e para alguns o comportamento em ensaios preliminares. Os dados relativos a cada isolamento são apresentados no quadro I.

Aos isolamentos mencionados no quadro I foram dados, durante o transcorrer do trabalho, os seguintes nomes: isolamentos "originais", "purificados", "3ª passagem pela parte aérea da planta" e "3ª passagem pela raiz da planta". Isolamen-

tos "originais" foram aquêles resultantes dos isolamentos feitos de plantas doentes oriundas das regiões de Presidente Prudente, Presidente Bernardes e Irapuru. As culturas "purifica-

QUADRO I - Local de origem, variedade do hospedeiro e código para os diferentes isolamentos do patógeno.

Coletado no Município de	Variedade do hospedeiro	Código	Nomenclatura
Pres. Prudente	Acala	PPAc5H	"Original"
Pres. Prudente	Acala	7	PPAc5H"Purificado"
Piracicaba	IAC-RM4	7-9	PPAc5H"3P.P.A."
Piracicaba	IAC-RM4	7-19	PPAc5H"3P.P.R."
Pres. Bernardes	IAC-RM1	PBA1H	"Original"
Pres. Bernardes	IAC-RM1	8	PBA1H"Purificado"
Piracicaba	Acala 3109	8-7	PBA1H"3P.P.A."
Piracicaba	Acala 3109	8-17	PBA1H"3P.P.R."
Pres. Bernardes	IAC-RM1	PBA3H	"Original"
Pres. Bernardes	IAC-RM1	9	PPA3H"Purificado"
Piracicaba	IAC-12	9-8	PBA3H"3P.P.A."
Piracicaba	IAC-12	9-18	PBA3H"3P.P.R."
Irapuru	IAC-RM1	IRA2H	"Original"
Irapuru	IAC-RM1	10	IRA2H"Purificado"
Piracicaba	Acala 3109	10-7	IRA2H"3P.P.A."
Piracicaba	Acala 3109	10-17	IRA2H"3P.P.R."
Pres. Prudente	IAC-RM1	PPA5H	"Original"
Pres. Prudente	IAC-RM1	PPA1H	"Original"
Pres. Prudente	IAC-RM1	PPA2H	"Original"
Pres. Bernardes	RM1	PBA1A	"Original"
Pres. Prudente	All-In-One	PPI-1	"Original"
Pres. Prudente	Acala	PPAc3A	"Original"

"3P.P.A." = 3ª passagem pela parte aérea da planta.

"3P.P.R." = 3ª passagem pela raiz.

das" originaram dos isolamentos "originais" após o plaqueamento de suspensões de conídios em diluições seriadas. Para cada isolamento "original" este processo foi repetido 3 vezes tendo-se tomado o cuidado de reisolar, após cada plaqueamento, uma colônia bem separada. Os isolamentos denominados "3ª passagem pela parte aérea" e "3ª passagem pela raiz" da planta hospedeira resultaram da passagem seriada dos isolamentos "purificados" pelas diferentes variedades e linhagem do hospedeiro. A expressão "pressão de seleção" foi atribuída aos diferentes estágios pelos quais os isolamentos passaram, sendo eles respectivamente estágio de isolamento "original", "purificado", "3ª passagem pela parte aérea" e "3ª passagem pela raiz".

### 3.2. O hospedeiro

As variedades e linhagem de algodão utilizadas, tanto na passagem seriada do patógeno pelo hospedeiro como nos testes de patogenicidade para a determinação de um possível efeito seletivo exercido pelo hospedeiro sobre o patógeno, foram as variedades IAC-RM4 e IAC-12 e a linhagem de Acala 3109. A variedade IAC-RM4 e linhagem Acala 3109 são consideradas como resistentes ao Fusarium. A resistência ao Fusarium encontrada nelas é provavelmente semelhante a resistência em Gossypium hirsutum mencionada por SMITH e DICK (1960) a qual é conferida provavelmente por um par de gens dominantes juntamente com um complemento de gens menores. Como variedade suscetível, no presente estudo, foi utilizada a variedade IAC-12.

#### 4. MÉTODOS

##### 4.1. Meios de cultura utilizados

Os meios de cultura empregados para o cultivo dos isolamentos de Fusarium foram: o meio de Martin (1950) e o meio líquido de Armstrong (1958). O primeiro, utilizado para a obtenção dos isolamentos e reisolamentos do fungo, tinha a seguinte composição: Glicose, 10,0 gr.; Peptona, 5,0 gr.;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,0 gr.;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 gr.; Rose Bengal a 0,33%, 10,0 ml; Agar, 20,0 gr.; Água destilada, 1000 ml. O Sulfato de Estreptomina, componente do meio original, não foi usado em virtude da contaminação por bactérias, em estudos preliminares, ter sido baixa. O meio líquido de Armstrong foi usado para a produção de inóculo e tinha a seguinte composição: Glucose, 2,0%;  $\text{MgSO}_4$ , 0,003 M; KCl, 0,022 M;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,008 M;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0,0356 M;  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{MnSO}_4$  e  $\text{ZnSO}_4$  cada um na concentração de 0,2 p.p.m. para cada cation.

Os isolamentos e reisolamentos obtidos para o Fusarium foram preservados em solo arenoso úmido autoclavado a 1 atmosfera de pressão durante 30 minutos.

##### 4.2. Solução nutritiva e condições ambientais mantidas durante os experimentos.

Durante a realização dos experimentos I, II, III e IV a temperatura da estufa foi mantida entre 26°C e 32°C. As plantas nos experimentos foram regadas 2 vezes por semana com a 2ª solução comercial recomendada por MALAVOLTA e HAAG (1964), sendo nos demais dias da semana regadas com água de torneira.

#### 4.3. Técnicas de isolamento e reisolamento

Os isolamentos e reisolamentos do patógeno a partir de plantas afetadas foram obtidos da maneira que segue: Hastes das quais se pretendia isolar o patógeno foram primeiramente lavadas com água e sabão. Em seguida, o material foi lavado com uma solução contendo uma parte da solução comercial de Hipoclorito de Sódio, contendo 5% de cloro ativo, e três partes de água. A seguir, com um escalpelo estéril, foi removida a casca, do material do qual se pretendia isolar o patógeno, e pequenos pedaços do lenho foram cortados e colocados em placas de petri contendo o meio de Martin. Para o isolamento do patógeno das raízes estas foram também lavadas com água e sabão e em seguida com a solução diluída de Hipoclorito de Sódio. Para a esterilização superficial as raízes foram deixadas na solução de Hipoclorito de Sódio, a 5%, por um período aproximado de 1 minuto. As raízes, em pequenos segmentos, assim tratadas foram transferidas diretamente para as placas de petri contendo o meio de Martin.

As placas de petri, contendo os tecidos das plantas em contato com o meio de cultura, foram incubadas à temperatura ambiente.

#### 4.4. Efeito da concentração do inóculo, idade das plantas e método de inoculação nos experimentos I e II.

Com a finalidade de serem melhor conhecidos os possíveis efeitos da concentração do inóculo, idade das plantas na época da inoculação e métodos de inoculação sobre a severidade da doença, em plantas resistentes da variedade IAC-RM4,

foram realizados simultaneamente 2 experimentos nos quais foram testados os fatores citados,

#### 4.4.1. Obtenção e concentração do inóculo

Nos experimentos I e II, foi utilizado o isolamento de Fusarium com código IRA2H obtido de planta da variedade RMI colhida no município de Irapuru. Um pouco do substrato arenoso autoclavado, usado na preservação do isolamento e contendo as estruturas do patógeno em questão, foi transferido assêticamente para placas de petri contendo o meio de Martin. Nestas o fungo se desenvolveu durante um período de 5 dias em condições ambientais de laboratório. Após este período, foi retirado da região próxima à periferia da colônia um disco de agar com 5 mm de diâmetro, contendo o crescimento do fungo e transferido para frascos erlenmeyer contendo o meio líquido de Armstrong.

Para a produção do inóculo que foi utilizado no processo de inoculação de Armstrong, experimento I, o disco de agar contendo o crescimento do fungo foi transferido para frascos erlenmeyer, com capacidade para um volume de 3000 ml, que continham 1000 ml de meio líquido de Armstrong. Os frascos foram mantidos em temperatura ambiente por um período de 3 dias sendo agitados 3 vezes ao dia. O inóculo que foi utilizado no método de inoculação denominado "Dipping", experimento II, foi obtido transferindo-se o disco de agar, disco semelhante àquele descrito para o processo anterior, para frascos erlenmeyer, com capacidade para um volume de 250 ml, contendo cada um 50 ml de meio líquido. Os frascos foram mantidos em agitador mecânico e à temperatura ambiente por 3 dias.

Para ambos os métodos de inoculação, o inóculo concentrado foi aquele produzido nos respectivos frascos após o período de 3 dias. Do inóculo concentrado, para ambos os métodos de inoculação, foram feitas 3 diluições sendo elas 1 parte do inóculo concentrado para igual volume de água, 1 parte do inóculo concentrado para 9 partes de água e 1 parte do inóculo concentrado para 99 partes de água. A água utilizada para a diluição foi água de torneira.

#### 4.4.2. Obtenção de plantas da variedade IAC-RM4 com diferentes idades

O possível efeito da idade das plantas sobre a resistência das mesmas foi estudado em plantas da variedade IAC-RM4 cultivadas em solo autoclavado. As plantas que foram inoculadas pelo método de Armstrong, experimento I, foram obtidas plantando-se as sementes, previamente deslintadas em ácido sulfúrico concentrado, em areia de rio autoclavada dispondo as sementes em círculo diretamente nos vasos onde foi feita a inoculação. Para a inoculação das plantas pelo método de "Dipping", as sementes, também previamente deslintadas com ácido sulfúrico, foram plantadas em caixas de madeira contendo areia de rio autoclavada. Por ocasião da inoculação, as plantas foram removidas das caixas sendo em seguida transplantadas para vasos de barro contendo areia autoclavada.

O plantio das sementes, para a obtenção de mudas para ambos os métodos de inoculação, foi feito simultaneamente e com intervalos de 7 dias. As idades das plantas testadas para ambos os métodos foram 1, 2 e 3 semanas. As plantas com 1 semana de idade, por ocasião da inoculação, apresentaram as fô-

lhas verdadeiras muito pouco desenvolvidas, enquanto que aquelas com 3 semanas chegaram a apresentar até 3 fôlhas verdadeiras bem desenvolvidas.

#### 4.4.3. Métodos de inoculação

O método de inoculação, utilizado por Armstrong, consistiu, em linhas gerais, na transferência de inóculo do fungo, diretamente para o substrato onde se achavam as plantas. As sementes plantadas em círculo facilitaram a inoculação, a qual foi feita pressionando-se um funil invertido, de diâmetro ligeiramente menor que o do círculo de plantas, contra o substrato contendo as plantas e despejando-se na depressão feita em cada vaso 250 ml do inóculo a ser usado.

O método de inoculação pelo processo de "Dipping" consistiu em mergulhar-se o sistema radicular das plantas, após serem estas cuidadosamente removidas das caixas contendo areia de rio autoclavada, nos inóculos usados para os diferentes tratamentos. Após a inoculação, foram as plantas transplantadas para vasos de barro contendo areia de rio autoclavada.

#### 4.4.4. Teste de patogenicidade

Os testes de patogenicidade pelos métodos de Armstrong, experimento I, e "Dipping", experimento II, nos quais foram estudados os efeitos da concentração do inóculo e idade das plantas, obedeceram um delineamento fatorial para 4 concentrações do inóculo e 3 idades de plantas sendo cada tratamento repetido 3 vezes. Para o experimento no qual foi utilizado o método de inoculação de Armstrong, o número de plantas



não foi o mesmo para tôdas as parcelas, enquanto que no experimento no qual foi utilizado o método de "Dipping", o número de plantas, para todos os tratamentos, foi igual a seis. Em ambos os experimentos foram incluídos tratamentos que consistiram de plantas não inoculadas. Estes tratamentos tiveram a finalidade de revelar possíveis erros ou contaminações durante a realização dos experimentos.

#### 4.5. Teste de patogenicidade para isolamentos "originais" de Fusarium experimento III

Os isolamentos "originais" usados no experimento III foram: PPA5H, PPA1H, PPA2H, PBA1A, PPAC3A e PPI-1. Cada isolamento foi inoculado quando as plantas apresentavam 2 folhas verdadeiras. O método de inoculação usado foi o de Armstrong, e o inóculo consistiu do inóculo concentrado produzido por cada isolamento. O delineamento seguido foi o delineamento fatorial constituído por 6 isolamentos testados cada um nas variedades IAC-12 e IAC-RM4 como também na linhagem Acala 3109. Os tratamentos distribuídos em blocos inteiros casualizados foram repetidos 4 vezes, sendo que cada parcela foi constituída de 10 plantas. Para cada variedade foram incluídos tratamentos que não receberam inóculo do patógeno com a finalidade de servirem como testemunhas.

#### 4.6. Passagens seriadas do patógeno pelo hospedeiro

##### 4.6.1. Obtenção das plantas e inoculação das mesmas

As plantas hospedeiras das variedades e linhagem, usadas para as passagens seriadas do patógeno pelo hospedeiro,

foram obtidas plantando-se aproximadamente 10 sementes para cada combinação isolamento-variedade, por vaso de barro contendo aproximadamente 3,700 litros de solo autoclavado. Com o decorrer do tempo, as plantas foram raleadas sendo deixadas quatro por vaso. Para a passagem sucessiva do patógeno pela parte aérea das plantas foi aguardado o período de tempo necessário para que as plantas apresentassem mais de quatro folhas verdadeiras.

A inoculação foi feita colocando-se uma alça de repicagem, previamente flambada, contendo o inóculo concentrado do fungo na haste principal da planta, logo abaixo da segunda folha verdadeira, e fazendo-se um ferimento com um escalpelo estéril na área delimitada pela alça. Por este processo o inóculo contido na alça foi introduzido nos tecidos da planta. Os períodos durante os quais os fungos permaneceram no hospedeiro foram aproximadamente de um mês, para a 1ª, 2ª e 3ª passagem, quando então foram reisolados. Durante as passagens sucessivas, as variedades IAC-RM4 e IAC-12 foram usadas respectivamente para os isolamentos PPAc5H e PBA3H, enquanto que para os isolamentos PBA1H e IRA2H foi utilizada a linhagem Acala 3109.

Para as passagens do patógeno pelas raízes das plantas hospedeiras, as plantas foram obtidas semeando-se quatro a cinco sementes, previamente deslintadas, em saquinhos plásticos contendo solo autoclavado. Os saquinhos plásticos foram inclinados de modo a permitirem o desenvolvimento das raízes rente a superfície plástica dos mesmos. A inoculação foi feita, em média 7 dias após o plantio, mediante a injeção do inóculo concentrado na raiz principal. Para a inoculação foi uti

lizada uma agulha de injeção nº 18 acoplada a uma seringa. Os reisolamentos para a 1ª., 2ª. e 3ª. passagem foram feitos tão logo os seedlings apresentaram os sintomas da doença.

4.6.2. Teste de patogenicidade, experimento IV, para os isolamentos resultantes das diferentes "pressões de seleção"

Os isolamentos "purificados", "3ª passagem pela parte aérea" e "3ª passagem pela raiz" resultantes dos isolamentos "originais" de PPac5H, PBA1H, PBA3H e IRA2H foram testados, cada um, nas variedades IAC-RM4 e IAC-12 como também na linhagem Acala 3109. O processo de inoculação usado foi o método de "Dipping", o qual foi feito quando as plantas apresentaram 3 ou mais folhas verdadeiras. O inóculo consistiu de uma parte do inóculo concentrado para 3 partes de água. Para cada combinação isolamento-variedade foram inoculadas 18 plantas, transplantadas para 3 vasos de barro em número de 6 plantas por vaso. Cada vaso continha areia de rio autoclavada como substrato.

O delineamento utilizado para o experimento foi um fatorial constituído de 4 isolamentos diferentes por 4 "pressões de seleção" em 3 hospedeiros. Os tratamentos dispostos em blocos inteiros casualizados foram repetidos 3 vezes. Cada variedade e linhagem também foi plantada sem ser inoculada o que constituiu as testemunhas.

4.7. Método de avaliação da severidade da doença

O estado mórbido das plantas se manifestou através

de sintomas externos e internos que revelaram distúrbios na fisiologia normal do hospedeiro. Os sintomas externos que apareceram durante a realização dos trabalhos experimentais foram os seguintes: clareamento das nervuras das folhas, amarellecimento do limbo foliar com posterior necrose, enfezamento e morte das plantas. Quanto aos sintomas internos foi observado o escurecimento dos vasos lenhosos das raízes, caule e pecíolo das folhas.

O critério usado para medir a severidade de doença foi baseado nos sintomas externos e internos. A avaliação da severidade da doença baseada nos sintomas externos foi feita atribuindo-se as notas (0,1), (0,5) e (1,0) respectivamente a plantas sem sintomas externos, com sintomas externos e plantas mortas. A avaliação da severidade da doença baseada em sintomas internos foi limitada, simplesmente, à determinação da presença ou ausência destes.

## 5. RESULTADOS

Os resultados obtidos no experimento I, quando as plantas foram inoculadas pelo método de Armstrong, são apresentados no quadro II.

A análise da covariância para os dados do quadro II é apresentada no quadro III.

QUADRO II - Sintomas externos e número de plantas, por parcela, para os tratamentos constituídos de diferentes concentrações de inóculo e idades das plantas inoculadas segundo Armstrong

Tratamentos	1ª. Repetição	2ª. Repetição	3ª. Repetição
Concentrações Idade das N° de Severidade N° de Severidade			
de inóculo Plantas Plantas de doença Plantas de doença			
Concentrado 1 semana 12 2,9*	13	5,4	11 3,2
(C) 2 semanas 12 6,6	12	3,6	11 2,7
3 semanas 15 2,8	11	4,8	11 4,9
Concentrado 1 semana 14 3,5	17	5,5	15 4,4
c/igual vol. 2 semanas 12 3,6	11	3,2	10 2,6
de água 3 semanas 11 3,9	9	1,3	12 2,9
Concentrado 1 semana 10 1,0	13	2,2	15 4,0
Diluído pa- 2 semanas 7 2,7	14	4,7	12 1,2
ra 1/10 3 semanas 13 2,9	11	2,7	9 2,5
Concentrado 1 semana 14 2,2	13	2,1	13 1,7
Diluído pa- 2 semanas 13 4,1	14	2,6	12 1,2
ra 1/100 3 semanas 10 3,0	11	1,9	11 1,9

\* N°s correspondentes à severidade de doença por parcela resultante da soma das notas atribuídas à cada planta.

QUADRO III - Análise da covariância para os efeitos de concentração do inóculo e idades das plantas sobre a severidade da doença na variedade IAC-RM4.

Causa da Variação	GL	Soma de Quadrados e Produtos			Y ajustado para X		
		x <sup>2</sup>	xy	y <sup>2</sup>	SQ	QM	F
Total	35	137,889	31,956	60,683			
Blocos	2	2,389	1,622	2,303			
Idades (A)	2	30,889	2,039	0,504			
Concentrações(B)	3	3,666	0,333	17,520			
(A) (B)	6	28,667	10,650	5,872			
Erro	22	72,278	17,312	34,484	21	30,338	1,444
Idades + Erro	24	103,167	19,351	34,988	23	31,359	
Idades ajustadas					2	1,021	0,510 0,353
Concentrações + Erro	25	75,944	17,645	52,004	24	47,905	
Concentrações Ajustadas					3	17,567	5,855 4,054*
(A) (B) + Erro	28	100,945	27,962	40,356	27	32,611	
(A) (B) ajustada					6	2,273	0,378 0,261

Pela análise da covariância foi observado um efeito significativo ao nível de 5% da probabilidade para o efeito de concentrações do inóculo. Neste experimento não foi notado efeito significativo quer para idades das plantas quer para as interações idades das plantas e concentrações de inóculo.

As médias ajustadas para as concentrações C; C 1/2, C 1/10 e C 1/100 foram respectivamente 4,11; 3,36; 2,77 e 2,23. A diferença mínima significativa calculada pelo teste de Tukey, para concentrações ajustadas, ao nível 5% de probabilidade, foi de 1,591. O teste de Tukey revelou diferenças

significativas ao nível de 5% de probabilidade, entre as médias ajustadas para concentrações C e C 1/100. As concentrações C 1/2 e C 1/10 ocuparam uma posição intermediária.

Os resultados do experimento II, no qual foi utilizado o método de inoculação denominado "Dipping" são apresentados no quadro IV.

QUADRO IV - Severidade de doença medida em sintomas externos, por parcela, para os tratamentos constituídos por diferentes concentrações do inóculo e diferentes idades das plantas inoculadas por "Dipping"

<u>Tratamentos</u>				
Concentrações do inóculo	Idade das plantas	1ª. Repetição	2ª. Repetição	3ª. Repetição
Concentrado	1 semana	6,0*	6,0	6,0
	2 semanas	5,5	4,5	5,0
	3 semanas	4,5	5,0	6,0
Concentrado c/igual volume de água	1 semana	6,0	6,0	6,0
	2 semanas	5,5	5,5	4,1
	3 semanas	5,5	5,0	4,5
Concentrado diluído para 1/10	1 semana	6,0	6,0	5,5
	2 semanas	5,5	5,0	4,5
	3 semanas	5,0	4,1	5,1
Concentrado diluído para 1/100	1 semana	5,1	4,6	4,1
	2 semanas	5,0	6,0	4,5
	3 semanas	4,0	4,6	4,1

\* N<sup>o</sup>s correspondentes a severidade de doença por parcela resultante da soma das notas atribuídas a cada uma das 6 plantas.

A análise da variância baseada nas médias por parce-

la para os dados apresentados no quadro IV, com exceção dos dados referentes aos tratamentos para plantas com uma semana de idade, é apresentada no quadro V. Os tratamentos para plantas com uma semana de idade não entraram na análise da variância em virtude da mesma ter sido nula para duas concentrações o que foi devido a morte de tôdas as plantas nas 3 repetições

QUADRO V - Análise da variância para os efeitos de concentração do inóculo e idades das plantas sôbre a severidade da doença na variedade IAC-RM4 quando foi utilizado o método de inoculação de "Dipping"

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Blocos	2	0,013	0,0065	0,601
Tratamentos	7	0,055	0,0078	0,722
Concentrações	3	0,014	0,0046	0,425
Idades	1	0,012	0,012	1,111
Concentrações x Idades	3	0,029	0,0096	0,888
Erro	14	0,152	0,0108	
Total	23	0,220		

A análise da variância não revelou dados significativos para os efeitos de concentrações do inóculo e idade das plantas com 2 e 3 semanas, na ocasião da inoculação.

Não levando em consideração os tratamentos concentrado e concentrado diluído para metade aplicados a plantas com 1 semana de idade, as médias de severidade de doença obtidas para as concentrações C, C 1/2, C 1/10 e C 1/100 foram respectivamente 0,847; 0,835; 0,864 e 0,777, enquanto que as médias de severidade de doença para plantas inoculadas com 1, 2 e 3 semanas foram respectivamente 0,869; 0,841 e 0,796.



Os dados obtidos para o experimento III, no qual diferentes isolamentos originais foram testados em diferentes variedades, são apresentados no quadro VI.

QUADRO VI - Severidade da doença medida em sintomas externos, por parcela, para os tratamentos no experimento III.

Isolamentos "originais"	Variedades e linhagem testadas	Repetições			
		1ª	2ª	3ª	4ª
PPA5H	IAC-12	5,0*	6,1	4,8	6,5
	Acala 3109	1,8	1,4	1,8	1,0
	IAC-RM4	1,8	1,9	2,2	1,4
PPA1H	IAC-12	9,0	6,5	7,1	7,5
	Acala 3109	3,0	3,5	4,8	3,0
	IAC-RM4	3,6	2,2	4,6	3,5
PPA2H	IAC-12	5,6	6,1	6,5	5,7
	Acala 3109	3,0	1,8	3,1	2,2
	IAC-RM4	2,2	2,6	2,6	2,2
PBA1A	IAC-12	6,6	7,0	5,3	7,0
	Acala 3109	2,6	2,6	2,2	3,5
	IAC-RM4	2,2	2,2	1,4	1,4
PPAc 3A	IAC-12	6,6	6,5	3,4	3,8
	Acala 3109	1,4	2,2	1,0	2,2
	IAC-RM4	2,2	1,4	1,8	1,4
PPI-1	IAC-12	5,4	6,1	7,6	8,2
	Acala 3109	4,2	1,8	2,6	3,5
	IAC-RM4	2,2	3,6	2,2	4,2

\*Nºs correspondentes a severidade de doença por parcela resultantes da soma das notas atribuídas a cada uma das 10 plantas.

A análise da variância baseada nas médias por parce-

la para os dados do quadro VI, é apresentada no quadro VII.

QUADRO VII - Análise da variância para os efeitos de isolamentos e variedades sôbre a severidade de doença no experimento III.

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Blocos	3	0,005	0,0016	0,215
Tratamentos	17	2,712	0,159	21,486**
Isolamentos	5	0,3583	0,0716	9,675**
Variedades	2	2,3227	1,1613	156,932**
IAC-12 vs Acala e				
IAC-RM4	1	2,321	2,321	313,648**
Acala vs IAC-RM4	1	0,001	0,001	0,135
Isolamentos x variedades	10	0,0310	0,0031	0,418
Erro	51	0,3806	0,0074	
Total	71	3,0976		

A análise da variância revelou diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade, entre os isolamentos. As médias para os isolamentos PPA1H, PPI-1, PBA1A, PPA2H, PPA5H e PPAc3A foram respectivamente 0,485; 0,430; 0,366 ; 0,363; 0,298 e 0,282. Com uma diferença mínima significativa, ao nível de 1% de probabilidade, de 0,126, o teste de Tukey revelou diferenças significativas entre as médias de severidade de doença causadas pelos isolamentos PPA1H e PPI-1 e as médias de severidade de doença causadas por PPA5H e PPAc3A.

A análise também revelou um efeito significativo, ao nível de 1% de probabilidade, entre as variedades. As médias de severidade de doença causadas na variedade IAC-12, linha - gem Acala 3109 e variedade IAC-RM4 foram respectivamente

0,625; 0,250 e 0,237. A diferença mínima significativa calculada pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade, foi de 0,076. O teste de Tukey revelou uma diferença significativa entre a média obtida para IAC-12 e as médias obtidas para as duas outras resistentes. A variedade resistente IAC-RM4 não diferiu significativamente da linhagem Acala 3109.

Os dados obtidos para o experimento IV, no qual foi estudado o efeito das passagens sucessivas do patógeno pelo hospedeiro, são apresentados no quadro VIII.

A análise da variância baseada nas médias por parcela dos dados obtidos para os 4 primeiros isolamentos do quadro VIII é apresentada no quadro IX.

A análise da variância revelou um efeito significativo, ao nível de 1% de probabilidade para o efeito de isolamentos ou melhor "grupo de isolamentos", isto é, o conjunto dos isolamentos oriundos de um mesmo isolamento original. As médias de severidade da doença obtidas para os "grupos de isolamentos" resultantes de PPAc5H, PBA1H, PBA3H e IRA2H foram respectivamente 0,7080; 0,5793; 0,5024 e 0,4658. A diferença mínima significativa calculada pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade, foi de 0,126. O teste de Tukey revelou diferença significativa entre a média do grupo de isolamento PPAc5H e as médias dos "grupos de isolamentos" oriundos de PBA1H, PBA3H e IRA2H, sendo que não houve diferença significativa entre os três últimos grupos.

A análise da variância também revelou diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade para as diferenças de severidade de doença nas 3 variedades de algodão testadas. As médias de severidade de doença na variedade IAC-12 li

QUADRO VIII - Severidade de doença medida em sintomas externos, por parcela, para os tratamentos constituídos por Isolamentos e "Pressão de Seleção" para as variedades IAC-12 e IAC-RM4 e Linhagem Acala 3109.

Isolamentos	Variedades e Linhagens	"P R E S S A O D E S E L E Ç Ã O"											
		"Original"			"Purificado"			3ª P.P.A.			3ª P.P.R.		
		1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª
PPAC5H	IAC-12	6,0*	6,0	5,1	6,0	5,1	6,0	4,2	5,1	3,3	5,1	1,9	0,6
	Acala 3109	5,1	4,6	5,1	4,6	4,6	4,2	5,1	4,6	4,2	1,9	2,4	4,6
	IAC-RM4	5,5	3,2	3,3	6,0	4,2	3,7	2,8	3,2	6,0	2,8	3,7	3,2
PBA1H	IAC-12	3,3	4,1	3,3	5,5	5,0	3,3	5,1	2,8	5,1	3,7	5,1	6,0
	Acala 3109	1,9	3,3	2,8	1,4	2,4	1,9	2,3	5,0	3,7	1,9	3,2	3,6
	IAC-RM4	2,8	2,8	2,7	3,7	3,2	5,1	3,3	1,9	1,0	4,2	4,2	4,6
PBA3H	IAC-12	2,8	5,1	4,2	5,1	4,2	3,3	1,4	3,3	4,1	2,8	4,6	2,4
	Acala 3109	3,2	3,3	2,8	2,4	1,4	1,9	1,9	2,7	1,0	1,4	2,8	2,8
	IAC-RM4	2,4	3,7	3,3	3,3	3,7	2,8	1,5	1,9	3,2	4,1	3,7	4,1
IRA2H	IAC-12	3,3	3,3	2,8	1,9	2,8	4,6	2,4	4,6	5,1	2,8	3,7	3,3
	Acala 3109	2,4	0,6	3,7	1,5	2,3	1,5	2,8	1,9	3,3	3,6	3,3	1,0
	IAC-RM4	2,7	1,4	4,0	2,8	1,5	1,8	3,7	2,8	2,8	3,2	2,3	3,2
IRA4H	IAC-12	5,1	4,2	2,8	5,1	3,7	3,3	3,7	3,3	5,5			
	Acala 3109	3,6	3,6	3,7	4,2	4,5	4,2	4,6	3,2	2,2			
	IAC-RM4	2,4	1,9	3,2	2,4	3,7	3,7	3,2	4,2	2,4			
PBA1H	IAC-RM4	4,5	3,5	5,0									
PPI-1	IAC-RM4	6,0	6,0	6,0									

\* Nos correspondentes a severidade de doença por parcela resultante da soma das notas atribuídas a cada uma das 6 plantas.

nhagem Acala 3109 e variedade IAC-RM4 foram respectivamente - 0,6615; 0,5447 e 0,4854. O teste de Tukey com uma diferença mínima significativa, ao nível de 1% de probabilidade, de 0,1018, revelou diferenças significativas, entre a severidade de doença na variedade IAC-12 e a severidade de doença na linhagem Acala 3109 e variedade IAC-RM4.

QUADRO IX - Análise da variância para o experimento IV no qual foram estudados os efeitos das passagens sucessivas do patógeno pelo hospedeiro sobre a severidade de doença causada em 3 variedades de algodão.

Causa da variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Blocos	2	0,0097	0,0048	0,175
Tratamentos	47	4,0050	0,0852	3,109***
Isolamentos	3	1,2389	0,4129	15,069***
"Pressão de Seleção"	3	0,0376	0,0125	0,456
Variedades	2	0,7712	0,3856	14,072**
Isolamentos X "Pres. Se leção"	9	1,0638	0,1182	4,313**
Isolamentos X Variedades testadas	6	0,2005	0,0334	1,218
"Pressão de Seleção X Variedades testadas	6	0,3585	0,0597	2,178
Isolamentos X "Pressão de Seleção" X Variedades	18	0,3343	0,0185	0,675
Erro	94	2,5824	0,0274	
Total	143	6,5971		

Também foi notado um efeito significativo, ao nível de 1% de probabilidade, e uma tendência para significância respectivamente para as interações "pressão de seleção" x isolamentos e "pressão de seleção" x variedades testadas.

O desdobramento dos graus de liberdade para "pressão de seleção" e "pressão de seleção" x isolamentos é apresentado no quadro X.

QUADRO X - Análise da variância para o efeito de "pressão de seleção" dentro de isolamentos.

Causa de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
"Pressão de seleção" dentro de PPAC5H	3	0,6644	0,2214	8,0802**
"Pressão de seleção" dentro de PBA1H	3	0,1445	0,0481	1,7554
"Pressão de seleção" dentro de PBA3H	3	0,1681	0,0560	2,0437
"Pressão de seleção" dentro de IRA2H	3	0,1243	0,0414	1,5120
Erro	94	2,5824	0,0274	

A análise da variância revelou um efeito significativo, ao nível de 1% de probabilidade para o efeito das "pressões de seleção" dentro do isolamento PPAC5H. As médias de severidade de doença para os isolamentos "original", "purificado", "3ª passagem pela parte aérea" do hospedeiro e "3ª passagem pela raiz" oriundos do isolamento PPAC5H foram respectivamente 0,8220; 0,8127; 0,7127 e 0,4847. A diferença mínima significativa calculada pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade, foi de 0,2534. O teste de Tukey aplicado às médias de severidade de doença causadas pelos diferentes isola-

mentos, resultantes do isolamento PPAc5H, revelou diferenças significativas, entre as severidades de doença causadas pelos isolamentos "original" e "purificado", que não diferiram entre si, e a severidade de doença causada pelo isolamento resultante da "3ª passagem pela raiz". A severidade de doença causada pelo isolamento resultante da "3ª. passagem pela parte aérea" da planta, ocupou uma posição intermediária não diferindo dos três isolamentos acima mencionados.

Por outro lado, o desdobramento dos graus de liberdade para isolamentos e "pressão de seleção" x isolamentos é apresentado no quadro XI.

QUADRO XI - Análise da variância para o efeito de isolamentos dentro das "pressões de seleção".

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Isolamentos dentro de "original"	3	0,7035	0,2345	8,5583**
Isolamentos dentro de "purificado"	3	0,9084	0,3028	11,0510**
Isolamentos dentro de 3PPA	3	0,4740	0,1580	5,7654**
Isolamentos dentro de 3PPR	3	0,2167	0,0722	2,6350
Erro	94	2,5824	0,0274	

A análise da variância revelou um efeito significativo, ao nível de 1% de probabilidade, para o efeito de isolamentos dentro das "pressões de seleção", "original", "purificado" e "3ª passagem pela parte aérea" da planta. As médias de severidade de doença causadas pelos isolamentos "originais"

PPAc5H, PBA3H, PBA1H, IRA2H foram respectivamente 0,8127; 0,5701; 0,4996 e 0,4478. A diferença mínima significativa calculada pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade, foi de 0,2534. O teste de Tukey revelou diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade, entre a severidade de doença causada pelo isolamento "original" PPAc5H e os isolamentos PBA1H e IRA2H. O isolamento PBA3H ocupou uma posição intermediária não diferindo dos demais. Para a "pressão de seleção" "purificado", as médias de severidade de doença causada pelos isolamentos oriundos de PPAc5H, PBA1H, PBA3H e IRA2H foram respectivamente 0,8220; 0,5830; 0,5201 e 0,3830. O teste de Tukey revelou diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade, entre a severidade de doença causada pelos isolamentos "purificados" oriundos de PPAc5H e dos isolamentos PBA3H e IRA2H. O isolamento "purificado" originado de PBA1H ocupou uma posição intermediária não diferindo significativamente de nenhum dos outros isolamentos purificados. As médias de severidade de doença causada pelos isolamentos de PPAc5H; PBA1H, IRA2H e PBA3H resultantes da "3ª passagem pela parte aérea da planta" foram respectivamente 0,7127; 0,5588; 0,5440 e 0,3885. O teste de Tukey revelou diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade, entre as médias de PPAc5H e PBA3H. Os outros dois isolamentos, com referência à severidade de doença causada, ocuparam posições intermediárias

Não foram notadas diferenças significativas entre as severidades de doença causada pelos 4 isolamentos, acima mencionados, após a "3ª passagem pela raiz".

O desdobramento dos graus de liberdade para variedades e variedades x "pressão de seleção" é apresentado no quadro XII.



QUADRO XII - Análise de variância para o efeito de variedades e linhagem dentro de "pressão de seleção"

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Variedades dentro de "original"	2	0,1884	0,0942	3,4379*
Variedades dentro de "purificado"	2	0,5968	0,2984	10,8905***
Variedades dentro de 3ª P.P.A.	2	0,1836	0,0918	3,3503*
Variedades dentro de 3ª P.P.R.	2	0,1609	0,0804	2,9343
Erro	94	2,5824	0,0274	

A análise da variância revelou efeitos significativos para as causas de variação: variedades dentro de "original", "purificado" e 3ª P.P.A. respectivamente aos níveis de 5%, 1% e 5% de probabilidade. As médias para IAC-12, Acala 3109 e IAC-RM4 dentro de "original" foram respectivamente 0,6845 ; 0,5385 e 0,5246. A diferença mínima significativa calculada pelo teste de Tukey aos níveis de 5% e 1% de probabilidade foram respectivamente 0,1621 e 0,2041. O teste de Tukey aplicado às médias obtidas para variedades dentro da "pressão de seleção" "original" mostrou que as variedades IAC-12 e IAC-RM4 se achavam, nos limites para a significância, ao nível de 5% de probabilidade. As médias obtidas para IAC-12, IAC-RM4 e Acala 3109 dentro de "purificado" foram respectivamente 0,7330; 0,5802 e 0,4177. O teste de Tukey revelou diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade, entre as médias obtidas para IAC-12 e Acala 3109. A média obtida para a variedade IAC-RM4 ocupou uma posição intermediária não

diferindo das duas previamente citadas. Para IAC-12, Acala 3109 e IAC-RM4 dentro da "3ª P.P.A." as médias foram respectivamente 0,6456; 0,5343 e 0,4731. O teste de Tukey revelou diferenças significativas, ao nível de 5% de probabilidade, entre as médias obtidas para a primeira e a última variedade.

Por outro lado o desdobramento dos graus de liberdade para o efeito de "pressão de seleção" e "pressão de seleção" x variedades é apresentado no quadro XIII.

QUADRO XIII - Análise da variância para o efeito de "pressão de seleção" dentro de variedades.

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
"Pressão de seleção" dentro de IAC-12	3	0,1448	0,0482	1,7591
"Pressão de seleção" dentro de Acala 3109	3	0,1318	0,0439	1,6021
"Pressão de seleção" dentro de IAC-RM4	3	0,1194	0,0398	1,4525
Erro	94	2,5824	0,0274	

A análise da variância não revelou diferenças significativas para os efeitos de "pressões de seleção" dentro das variedades.

Os números correspondentes a plantas mortas mais plantas com sintomas externos e os números de plantas sem sintomas externos porém com coloração do lenho, respectivamente, representadas por y e x, para cada parcela no experimento IV, são apresentados no quadro XIV.

QUADRO XIV - Número de plantas com sintomas externos e sem sintomas externos porém com sintomas internos, por parcela, no experimento IV, para os diferentes isolamentos do fungo.

Isolamentos do fungo	Variedade IAC-12			Linhagem Acala3109			Variedade IAC-RM4									
	Repetição			Repetição			Repetição									
	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª							
	y	x	y	x	y	x	y	x	y	x						
PPAc5H "Original"	6	0	6	0	5	1	5	1	5	1	6	0	4	1	3	3
"Purificado"	6	0	5	1	6	0	5	1	5	1	4	2	6	0	4	2
"3PPA"	4	2	5	0	3	2	5	1	5	1	4	1	3	2	4	2
"3PPR"	5	1	2	1	0	6	2	4	2	4	5	1	3	3	4	1
PBA1H "Original"	3	3	5	1	3	2	2	4	3	3	3	1	3	3	3	4
"Purificado"	6	0	6	0	3	2	2	4	2	4	2	4	4	1	4	2
"3PPA"	5	1	3	2	5	1	3	3	6	0	4	2	3	3	2	4
"3PPR"	4	2	5	1	6	0	2	4	4	2	5	1	4	2	4	2
PBA3H "Original"	3	3	5	1	4	1	4	2	3	3	3	3	2	4	4	1
"Purificado"	5	1	4	2	3	3	2	4	2	4	2	4	3	3	4	2
"3PPA"	2	4	3	3	5	1	2	3	4	2	1	4	1	2	2	4
"3PPR"	3	3	5	1	2	3	2	3	3	3	3	3	5	1	4	1
IRA2H "Original"	3	3	3	2	3	3	2	4	0	5	4	1	4	2	2	6
"Purificado"	2	4	3	2	5	1	1	3	3	2	1	4	3	0	1	5
"3PPA"	2	3	5	1	5	1	3	2	2	3	3	3	4	1	3	3
"3PPR"	3	3	4	2	3	2	5	1	3	2	1	3	4	2	3	4

y = Número de plantas mortas e plantas com sintomas externos.

x = Número de plantas só apresentando sintomas internos.

No experimento IV, os coeficientes obtidos no estudo da correlação existente entre o número de plantas com sintomas externos e sem sintomas externos, porém mostrando, estas últimas, sintomas internos, para as variedades IAC-12 e IAC-RM4 e linhagem Acala 3109 foram respectivamente -0,911; -0,774 e -0,921.

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para a variedade resistente IAC-RM4, quando foi utilizado o método de Armstrong, mostraram um efeito da concentração do inóculo sobre a severidade da doença. A severidade da doença diminuiu à medida que diminuiu a concentração do inóculo. Este fato pode ser atribuído, provavelmente, a diferenças na probabilidade de as partículas de inóculo das diferentes concentrações entrarem em contacto com as partes suscetíveis da planta. À medida que a concentração do inóculo foi elevada, aumentou também a probabilidade de se estabelecer a relação hospedeiro-patógeno. O aumento na probabilidade pode ser atribuído, provavelmente, não só a um aumento no número total de propágulos mas também a um aumento no número de propágulos infectivos no inóculo. Um aumento na concentração do inóculo aumentaria portanto a probabilidade para propágulos infectivos entrarem em contato com as partes suscetíveis da planta. O aumento na concentração do inóculo, quando foi utilizado o método de Armstrong, não resultou em alterações drásticas na severidade da doença, pois as médias de severidade de doença para os tratamentos que receberam a maior concentração de inóculo, foram inferiores a 0,5. Esta

nota foi atribuída, no presente trabalho, a plantas que apresentaram sintomas externos por ocasião da colheita dos experimentos. Foi interessante notar que o potencial de inóculo não tem somente efeito para plantas de algodão de variedades suscetíveis, mas também afetou plantas da variedade IAC-RM4, resistente ao complexo Fungo-Nematóides.

Usando-se o método de inoculação de Armstrong para a variedade IAC-RM4, não foi notado nenhum efeito sobre a severidade da doença, que pudesse ser atribuído a diferenças entre idades das plantas. Os ferimentos causados no sistema radicular foram menores em número e em severidade quando comparados àqueles produzidos pelo método de "Dipping". Os ferimentos no sistema radicular das plantas, quando foi utilizado o primeiro método de inoculação, foram limitados às raízes próximas a periferia e aquelas situadas na parte interna ao círculo formado pelas plantas no vaso. Os danos feitos no sistema radicular durante a inoculação, aparentemente, não afetaram o desenvolvimento das plantas, pois as mesmas não mostraram o sintoma de flacidez das folhas, por ocasião da inoculação, como foi notado em plantas inoculadas pelo método de "Dipping".

ARMSTRONG, MAC LACHLAN e WEINDGLING (1940), baseados no fato de que Fusarium oxysporum f. vasinfectum foi isolado de um número de plantas resistentes, maior do que aquele representado pelas plantas com sintomas externos, interpretaram o fato de que a resistência não se evidenciou no processo da penetração. A consequência mais provável deste fato foi de que a resistência se manifestou durante o processo de colonização do hospedeiro pelo patógeno.

A menor severidade de doença constatada no experimento I quando comparada àquela do experimento II pode ser provavelmente atribuída a uma inoculação menos drástica permitindo assim uma melhor manifestação dos genes de resistência.

No experimento no qual foi utilizado o método de "Dipping", não foram obtidas diferenças significativas na análise da variância para as diferentes idades e concentrações, isto provavelmente devido ao alto índice de severidade de doença obtido para os tratamentos. Quando porém as concentrações e idades são comparadas, sendo considerados todos os tratamentos, nota-se que há um decréscimo na severidade da doença à medida que as concentrações tornam-se mais diluídas e a idade das plantas aumenta. É muito importante o conhecimento da suscetibilidade das plantas da variedade IAC-RM4 quando inoculadas por processos drásticos e com suspensões concentradas do patógeno, pois o uso de um método severo de inoculação em plantas de variedades resistentes pode mascarar completamente a resistência em potencial em seleções feitas para a resistência ao fungo. A tendência para uma redução na severidade da doença em concentrações mais diluídas reforçou o dado referente ao efeito da concentração de inóculo notado para o método de inoculação de Armstrong. No método de "Dipping", os ferimentos foram muito mais drásticos que aqueles feitos por ocasião da inoculação pelo método de Armstrong, e provavelmente parte do retardamento no desenvolvimento das plantas pode ser atribuído aos extensivos ferimentos causados no sistema radicular. Em nenhum caso o desenvolvimento das plantas inoculadas pelo método de "Dipping" foi igual àquela apresentado pelas plantas inoculadas pelo método de Armstrong. Não foi possível medir

os efeitos referentes a ferimentos e inóculo nos resultados obtidos para os dois métodos de inoculação, pois o inóculo que foi produzido para o método de inoculação de Armstrong consistiu de grande quantidade de micélio enquanto que aquele produzido para o método de inoculação de "Dipping", consistiu quase que exclusivamente de conídios. Os potenciais dos inóculos usados nos dois experimentos provavelmente foram diferentes.

Foi interessante notar uma certa semelhança entre as tendências, para maior severidade de doença, quando foi utilizado o método de inoculação que causou ferimentos mais drásticos nas raízes e as observações que foram feitas por SMITH e DICK (1960) e SALGADO et al (1966). Os primeiros relataram que populações elevadas de nematóides mascararam a resistência de plantas de algodão a Fusarium, enquanto que os últimos mostraram que, para a variedade IAC-RM4, os efeitos para o inóculo constituído de Fusarium associado a nematóides não diferiram entre si nos diferentes substratos usados, mas que os efeitos obtidos para o inóculo constituído só do fungo, sem ferimentos nas raízes, diferiram entre si para os mesmos substratos usados.

Os dados obtidos no experimento III mostraram que os 3 isolamentos resultantes de 3 plantas diferentes de uma mesma variedade e colhidas no mesmo campo apresentaram diferenças significativas quanto a sua patogenicidade. Este fato sugere que a população de Fusarium existente em uma área pode ser constituída por biótipos que possuem diferentes graus de patogenicidade, o que se constitui em mais uma variável que influi nos trabalhos de melhoramento do algodoeiro.

A falta de obtenção de diferenças significativas para a interação isolamento x variedade mostrou que os isolamentos oriundos das variedades ALL-IN-ONE, IAC-RM1 e linhagem de Acala não apresentaram diferentes tendências quanto a patogenicidade quando testados nas variedades IAC-12, IAC-RM4 e linhagem de Acala 3109. O grau de resistência a Fusarium que foi observado na variedade IAC-RM4 e linhagem Acala 3109 foi muito semelhante. Isto justifica a utilização tanto da variedade IAC-RM4 como da linhagem Acala 3109 como fontes de resistência a Fusarium nos trabalhos de melhoramento do algodoeiro. A preferência a ser dada a uma ou outra dependerá do grau de resistência a nematóides.

O estudo para um possível efeito seletivo do hospedeiro sobre o patógeno revelou diferenças na patogenicidade para "grupos de isolamentos". A ocorrência de diferentes graus de severidade da doença causada pelos "grupos de isolamentos" sugeriu diferenças em patogenicidade para isolamentos de grupos diferentes. O conhecimento deste fato reforçou a significância dos dados no experimento III e mostrou a grande importância que deve ser dada à escolha dos campos onde serão feitos os experimentos de melhoramento, às repetições dentro de um experimento e a realização de experimentos em diferentes localidades. A escolha de campos em localidades diferentes e nos quais a doença ocorreu de forma severa em anos anteriores aumentará a probabilidade das plantas serem expostas a altas concentrações de inóculo, sendo este provavelmente constituído por biótipos de alta patogenicidade.

Quanto à "Pressão de seleção", considerando-se todos os isolamentos, os resultados mostraram que não houve diferen



ças significativas entre as mesmas. Foi interessante notar que não houve diferenças significativas no aumento de patogenicidade para as "pressões de seleção" constituídas pelos isolamentos "originais" e reisolamentos que passaram três vezes pela parte aérea e raízes das plantas. Este fato mostrou que, considerando-se todos os isolamentos, não foi observado nenhum aumento ou decréscimo em patogenicidade, considerando-se as 3 variedades em conjunto, que pudesse ser atribuído a um efeito de passagens seriadas pelo hospedeiro. Também mostrou, considerando-se todos os reisolamentos, que uma permanência curta do patógeno nas raízes teve o mesmo efeito que uma permanência mais longa na parte aérea da planta.

No experimento IV as variedades testadas mostraram diferentes graus de resistência aos isolamentos usados, e tiveram um comportamento semelhante àquele observado no experimento III. A variedade IAC-RM4, com resistência ao complexo Fusarium-Nematóides, não diferiu quanto a resistência a Fusarium da linhagem Acala 3109. O maior índice de severidade de doença observado para as variedades resistentes no experimento IV é provavelmente um fato semelhante aquele observado no experimento II, embora tenham sido utilizados isolamentos diferentes nos 2 experimentos e estes feitos também em épocas diferentes. A maior severidade de doença em plantas resistentes pode ser atribuída provavelmente a um efeito mais drástico no método de inoculação utilizado.

O efeito significativo para a interação "pressão de seleção" x isolamento mostrou que os isolamentos apresentaram diferentes tendências quanto a patogenicidade nas diferentes "pressões de seleção". O estudo do efeito de "Pressão de Sele

ção" dentro de isolamentos mostrou que o reisolamento de PPAc5H resultante da 3ª passagem pela raiz apresentou um grau de patogenicidade diferente daquele observado para os isolamentos "original" e "purificado" do mesmo fungo. Isto sugere a ocorrência de um estado dinâmico na patogenicidade de certos isolamentos. A perda de patogenicidade de isolamentos de fungos é um fato conhecido e dentre os vários fatores responsáveis ela pode ser causada pelo cultivo continuado do fungo em meios de cultura, o que representa provavelmente uma seleção de biótipos mais adaptados às condições de saprofitismo. Do ponto de vista prático para o melhoramento de plantas visando a resistência a Fusarium, redução na patogenicidade é de menor significância do que seria um aumento na mesma.

Os dados significativos obtidos para os "isolamentos dentro das "pressões de seleção", "original", "purificada" e "3ª passagem pela parte aérea" da planta podem ser atribuídos a alta patogenicidade dos isolamentos resultantes de PPAc5H, o que mostra outra vez a variabilidade na patogenicidade existente entre isolamentos do fungo.

O dado não significativo obtido para "pressão de seleção" dentro de variedades mostrou que a passagem seriada do patógeno pelo hospedeiro, considerando-se todos os isolamentos, não influenciou na patogenicidade dos mesmos às diferentes variedades testadas, quando consideradas separadamente. O estudo do efeito obtido para variedades dentro de "pressões de seleção" mostrou que as variedades resistentes não apresentaram diferenças significativas quanto ao comportamento nas "pressões de seleção", "original", "purificado" e "3ª passagem pela parte aérea" da planta. A variação na posição das va

riedades resistentes em relação à variedade suscetível, nas 3 "pressões de seleção" acima mencionadas, pode ser atribuída provavelmente a uma maior ou menor patogenicidade do conjunto de isolamentos às variedades resistentes, quando a patogenicidade foi medida em relação à variedade suscetível e mediante um processo violento de inoculação. Dado semelhante, embora não discutido sob este aspecto, foi obtido por SILVEIRA et al (1967) para as variedades Auburn 56, Rex Cotton e IAC-12 quando comparadas em testes de estufa.

O efeito não significativo obtido para a interação I solamentos x Variedades mostrou que os "grupos de isolamentos" apresentaram as mesmas tendências quando testados nas variedades IAC-12, IAC-RM4 e linhagem Acala 3109.

O estudo da relação existente entre os números de indivíduos com sintomas externos e sem sintomas externos, porém estes últimos com sintomas internos, revelou uma alta correlação entre as duas classes. A informação obtida foi importante e revelou que de modo geral a maioria dos casos de ocorrência dos sintomas internos pertencia ao quadro sintomatológico da doença. A correlação, considerando-se todos os isolamentos, entre as duas classes foi alta nas 2 variedades e na linhagem quando analisadas separadamente. A alta correlação entre as duas classes mostrou que a coloração dos vasos das plantas é um sintoma que deve ser levado em consideração quando for feita comparação entre variedades. O autor é de opinião que a atribuição de notas, com diferentes pesos, para plantas mortas, plantas com sintomas externos e plantas sem sintomas externos, estas últimas com sintomas internos, dá uma melhor idéia do grau de resistência de certas variedades do que o

simples cálculo da porcentagem de indivíduos que apresentam ou não sintomas externos da doença. O sistema de classificação de incidência de doença usado por SILVEIRA et al (1967), no qual os autôres se basearam na porcentagem de plantas sem sintomas, embora tenha dado resultados positivos, poderia ser rigoroso demais no início de um plano de melhoramento no qual a resistência a Fusarium e Meloidogyne fôssem provenientes de plantas de variedades diferentes. Esta consequência seria sanada por um método mais tolerante, algo semelhante ao apresentado neste trabalho, e que consistiria na consideração dos diferentes graus de severidade da doença.

## 7. CONCLUSÕES

Dos dados apresentados no presente trabalho, pode-se concluir o que segue.

1. O método de inoculação que consistiu na imersão das raízes no inóculo quando comparado com o método de inoculação usado por Armstrong foi mais severo resultando num número maior de plantas mortas e com sintomas.

2. A severidade da doença nas plantas resistentes da variedade IAC-RM4 pode ser influenciada pela concentração do inóculo.

3. Os biótipos de Fusarium isolados de plantas diferentes em um mesmo campo, podem diferir significativamente entre si quanto a sua patogenicidade.

4. Não foi detectado aumento na patogenicidade dos isolamentos que pudesse ser atribuído às passagens seriadas do patógeno pelo hospedeiro.

5. As variedades IAC-12 e IAC-RM4 juntamente com a linhagem Acala 3109 mostraram diferentes graus de resistência a Fusarium, sendo que as duas últimas não diferiram significativamente entre si. A posição da variedade IAC-RM4 e linhagem Acala 3109 com relação à variedade suscetível IAC-12 foi provavelmente influenciada pela patogenicidade dos isolamentos usados.

5. Os grupos de isolamentos apresentaram as mesmas tendências quando testados nas variedades IAC-12, IAC-RM4 e linhagem Acala 3109.

7. Os isolamentos apresentaram diferentes graus de patogenicidade quando testados em 3 variedades de algodão.

8. As classes formadas pelas plantas apresentando sintomas externos e plantas sem sintomas externos porém com sintomas internos mostraram boa correlação entre si quando as variedades IAC-12, IAC-RM4 e linhagem Acala 3109 foram estudadas separadamente.

## 8. RESUMO

Os efeitos da concentração do inóculo de Fusarium oxysporum f. vasinfectum (Atk.) Snyder e Hansen, e de diferentes idades das plantas da variedade resistente IAC-RM4, foram estudados para os métodos de inoculação de Armstrong e por "Dipping". Foi observado que o método de inoculação por "Dipping" foi muito mais drástico quando comparado com o método de Armstrong. Para este método foi observado um efeito, sobre a severidade da doença, que foi atribuído às diferentes concentrações de inóculo, enquanto que a análise estatística

para o efeito tanto da concentração do inóculo como da idade das plantas para o método de "Dipping" foi prejudicada devido ao alto índice de severidade de doença.

Os diferentes isolamentos de Fusarium, quando testados nas variedades IAC-12 e IAC-RM4 e na linhagem Acala 3109, mostraram diferentes graus de patogenicidade.

Considerando-se todos os isolamentos, a passagem seriada do patógeno pelo hospedeiro, quer fôsse pela parte aérea ou raiz da planta, não influiu em um aumento significativo na patogenicidade dos mesmos. Houve no entanto um caso, quando analisado separadamente, em que a patogenicidade de um isolamento foi significativamente reduzido após a 3ª passagem seriada pelas raízes do hospedeiro, quando comparado com o isolamento "original".

A variedade e linhagem resistentes a Fusarium, embora não apresentassem diferenças significativas entre si, quando comparadas à variedade suscetível e quando testadas para diferentes isolamentos, variaram no seu comportamento. Foi encontrada boa correlação entre o número de plantas com sintomas externos e plantas sem sintomas externos porém com sintomas internos para as 2 variedades e linhagem estudadas.

## 9. SUMMARY

The effects of inoculum concentration of Fusarium oxysporum f. vasinfectum (Atk.) Snyder and Hansen and age of resistant cotton plants on disease severity was determined by the inoculation method used by Armstrong and by the dipping method. The disease incidence and severity were much higher

when the latter was used. An effect attributed to inoculum concentration was observed for the Armstrong inoculation method, while for the dipping method the effects of both inoculum concentration and age of plants could not be entirely detected as a result of severe disease incidence.

The Fusarium isolates differed in degrees of pathogenicity when tested on cotton varieties differing in degree of susceptibility.

Considering all isolates tested, no significant increase in pathogenicity was observed after a serial passage of the isolates through the above ground part and roots of the host plant. One isolate when studied separately, showed a significant decrease in pathogenicity after 3 serial passages through the roots of the host plant.

The resistances observed in Acala 3109 and IAC-RM4 were not significantly different from each other. The degree of resistance of the resistant varieties when compared to the susceptible variety IAC-12 varied however for the different groups of fungus tested.

A high degree of correlation was detected between the number of plants with external symptoms and the number of plants without external symptoms but with internal vascular discoloration for the varieties IAC-12, IAC-RM4 and Acala 3109.

10. BIBLIOGRAFIA

ARMSTRONG, G.M., J.D.MAC LACHLAN e R.WEINDLING, 1940 - Variation in pathogenicity and cultural characteristics of the cotton wilt organism, *Fusarium vasinfectum*. Phytopathology, 30:515-520.

ARMSTRONG, G.M., B.S.HAWKINS e C.C.BENNETT - 1942 - Cross inoculations with isolates of Fusaria from cotton, tobacco and certain other plant subject to wilt. Phytopathology, 32:685-698.

ARMSTRONG, G.M. e JOANNE K.ARMSTRONG - 1948 - Nonsusceptible hosts as carriers of wilt Fusaria. Phytopathology, 38:808-826.

ARMSTRONG, JOANNE K. e G.M.ARMSTRONG - 1958 - A race of the cotton wilt *Fusarium* causing wilt of Yelredo Soybean and Flue - cured Tobacco. Plant Disease Reporter, 42:147-151.

ARMSTRONG, G.M. e JOANNE K.ARMSTRONG - 1964 - Lupinus species common hosts for wilt Fusaria from Alfafa, Bean, Cassia, Cowpea, Lupine and U.S.cotton. Phytopathology, 54: 1232 - 1235.

BALMER, E., E.J.KIEHL, F.GALLI, H.CAMPOS, C.SALGADO e E. CIA-  
1965 - Contribuição ao estudo da influência dos fatores físicos do solo, sobre a incidência da murcha do algodoeiro, causada por *Fusarium oxysporum f.vasinfectum* (Atk.) Snyder e Hansen. Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz", 22: 247-258.

~~BASTOS~~ CRUZ, B.P. } - 1959 - A fusariose do algodoeiro. Biológico



co, 25(2):45-47.

BURKHOLDER, W.H. - 1925 - Variations in a member of the genus Fusarium grown in culture for a period of five years. Am. J. Botany, 12:245-253.

BUXTON, E.W. - 1956 - Heterokaryosis and Parasexual Recombination in Patogenic Strains of Fusarium oxysporum. J. gen. Microbiol., 15:133-139.

CHRISTENSEN, J.J. e C.L.SCHNEIDER - 1948 - The effect of repeated passage of Helminthosporium sativum through the host on genetic variation and pathogenicity. Phytopathology, 38:5.

CHRISTENSEN, J.J. e J.E.DE VAY - 1955 - Adaptation of plant pathogen to host, Annual Review of Plant Physiology. 6: 367-392.

FAHMY, T. - 1927 - The Fusarium disease (Wilt) of cotton and its control. Phytopathology, 17:749-767.

MALAVOLTA, E. e H.P.HAAG - 1964 - Curso Internacional de Diagnose Foliar. IICA - ESALQ, Piracicaba, São Paulo. Mimeo - grafado.

MARTIN, J.P. - 1950 - Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungus. Soil Science, 69:215-233.

MC KEEN, C.D. e R.N.WENSLEY - 1961 - Longevity of Fusarium oxysporum in soil tube culture. Science, 134:1528-1529.

MILLS, W.R. - 1940 - Phytophthora infestans on tomato. Phyto-

pathology, 30:830-839.

- SALGADO, C., E.CIA, E.BALMER, A.R.MONTEIRO e C.P.de ABREU -  
1966 - Influência da porcentagem de areia no solo e Meloidogyne incognita (Kofoid e White) Chitwood sobre a incidência de murcha de algodoeiro causada por Fusarium oxysporum f.vasinfectum (Atk.) Snyder e Hansen. Anais da E.S. A "Luiz de Queiroz". (no prelo).
- SILVEIRA, A.P., B.P.BASTOS CRUZ, SALIMA G.P. e W.B.TOFFANO -  
1967 - Resistência varietal de algodoeiro à murcha de Fusarium (Fusarium oxysporum f.vasinfectum (Atk.) Snyder e Hansen). Arquivos do Instituto Biológico, 34:59-68.
- SMITH, A.L. e J.B.DICK - 1960 - Inheritance of resistance to Fusarium wilt in upland and Sea Island Cottons as complicated by nematodes under field conditions. Phytopathology 50:44-48.
- THARP, W.H. - 1938 - Sand-nutrient infection technique for the study of Fusarium wilt of cotton. Phytopathology, 28:206-209.
- THURSTON, H.DAVID e CAROL J.EIDE - 1953 - The survival of races of Phytophthora infestans in a mixture. Phytopathology, 43:486.
- WAGGONER, PAUL E. e J.R.WALLIN - 1952 - Variation in pathogenicity among isolates of Phytophthora infestans on tomato and potato. Phytopathology, 42:645-648.

## 11. AGRADECIMENTOS

O autor agradece a todos que diretamente ou indiretamente colaboraram na execução dos trabalhos da tese. Especialmente agradece,

ao Prof. Dr. F.GALLI pela orientação e estímulo;

aos Professôres Dr. C.C.ALLISON e Dr. H.BOYD pelas críticas feitas durante a execução dos trabalhos;

ao Dr. P.A.CAVALERI pelas facilidades concedidas durante certas fases do trabalho;

ao Dr. H.CAMPOS pelas sugestões e críticas nos trabalhos de análise estatística;

aos colegas Dr. H.TOKESHI, Dr. P.C.T.CARVALHO, H.KIMATI, C.O.N.CARDOSO, C.SALGADO e E.CIA por sugestões;

aos estudantes EDNEI DE CONTI e ATILIO MODELLI pelos auxílios na execução dos trabalhos, e

a Agência Norte-Americana para o Desenvolvimento Internacional (U.S.A.I.D.) pelas facilidades proporcionadas.

