

CAIO OCTAVIO NOGUEIRA CARDOSO  
ENGENHEIRO - AGRÔNOMO

Instrutor da 11.a Cadeira - Fitopatologia  
e Microbiologia da ESALQ - USP

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DAS RELAÇÕES  
ENTRE *Fusarium oxysporum* F. *phaseoli*  
(SCHLECHT) KENDR. E SNYD. E  
*Phaseolus vulgaris* L.

Tese apresentada à Escola Superior de  
Agricultura «Luiz de Queiroz», da Univer-  
sidade de São Paulo, para obtenção  
do Grau de «Magister Scientiae».

PIRACICABA - SÃO PAULO

1967

CAIO OCTAVIO NOGUEIRA CARDOSO  
ENGENHEIRO - AGRÔNOMO

Instrutor da 11.a Cadeira - Fitopatologia  
e Microbiologia da ESALQ - USP

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DAS RELAÇÕES  
ENTRE *Fusarium oxysporum* F. *phaseoli*  
(SCHLECHT) KENDR. E SNYD. E  
*Phaseolus vulgaris* L.

Tese apresentada à Escola Superior de  
Agricultura «Luiz de Queiroz», da Univer-  
sidade de São Paulo, para obtenção  
do Grau de «Magister Scientiae».

PIRACICABA - SÃO PAULO

1967

À minha esposa,

à minha mãe

e à memória de meu pai

dedico.

## CONTEÚDO

	Página
1. Introdução .....	1
2. Revisão Bibliográfica .....	2
3. Material .....	5
3.1. Patógeno .....	5
3.2. Hospedeiro .....	6
3.3. Substrato para o cultivo do hospedeiro e condições ambientais .....	7
3.4. Meios de cultura para o cultivo do patógeno e condições ambientais .....	7
4. Método .....	8
4.1. Tratamento das sementes, semeadura e obtenção de mudas .....	8
4.2. Métodos de inoculação .....	9
4.3. Isolamento, conservação e reisolamento do patógeno .....	10
4.4. Obtenção e diluição do inóculo .....	10
4.6. Método de avaliação .....	11
4.7. Estudo do efeito do método de inoculação, idade e variedade do hospedeiro, concentração do inóculo e método de avaliação - Experimento I .....	13
4.8. Estudo do efeito das concentrações de inóculo, variedade do hospedeiro e confirmação do índice de resistência - Experimento II .....	13
4.9. Estudo da variabilidade do patógeno "in vitro" - Experimento III .....	14
4.10. Estudo do efeito de diferentes isolamentos em diferentes concentrações de inóculo e em diversas variedades do hospedeiro - Experimento IV .....	14
5. Resultados .....	15



5.1.	Resultados do Experimento I .....	15
5.2.	Resultados do Experimento II .....	21
5.3.	Resultados do Experimento III .....	24
5.4.	Resultados do Experimento IV .....	24
6.	Discussão .....	34
7.	Conclusões .....	41
8.	Resumo .....	42
9.	Summary .....	44
10.	Bibliografia .....	46
11.	Agradecimentos .....	48

## 1. INTRODUÇÃO

O feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.) é uma das mais importantes fontes alimentícias do povo brasileiro. Apesar disto, esta cultura não apresenta, entre nós, grandes áreas de cultivo permanente que só a ela sejam reservadas. Normalmente, aparece como cultura secundária, não se lhe dando o lugar que mereceria dentro da Agricultura nacional.

Esta posição pode ser atribuída a diversos fatores como baixo rendimento por área, ocasionado, principalmente, por problemas fitossanitários.

Entre as principais doenças, como bacterioses, ferrugem, antracnose, etc., não se pode deixar de citar a murcha causada por Fusarium oxysporum f. phaseoli (Schlecht) Kendrick e Snyder, que, neste trabalho, será designado apenas por Fusarium. Foram encontradas culturas, onde esta doença causava prejuízo total. Assim, informações obtidas junto a lavradores de feijão-vagem indicam que a murcha de Fusarium parece ser uma das causas limitantes do cultivo desse vegetal, impedindo o plantio sucessivo em uma mesma área, por mais de dois ou três anos.

A fixação da cultura e a exploração mais intensiva e, portanto, mais econômica do feijoeiro fica dependente, em grande parte, de soluções dadas aos problemas fitossanitá-

Básicamente, as variedades resistentes à murcha causada por Fusarium deverão ser consideradas como a solução mais viável. Para tanto, é necessário um perfeito conhecimento do hospedeiro, do agente patogênico e das condições predisponentes à doença. Torna-se pois, necessária a obten-

ção de técnicas, as mais apuradas, para o seu estudo.

O presente trabalho visa fornecer algumas informações a respeito da doença em nossas condições. Assim, era interessante saber se há alguma resistência em variedades de feijoeiro aqui cultivadas, e a influência de fatores tais como a idade das plantas, concentração do inóculo, métodos de inoculação e avaliação bem como possíveis variações entre os isolamentos de Fusarium.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A murcha do feijoeiro causada por Fusarium, embora já conhecida desde 1929, quando HARTER (1929) a relatou pela primeira vez, ocorrendo no Vale do Sacramento na Califórnia, até hoje ainda não foi suficientemente estudada. Existem, por isso mesmo, dúvidas e controvérsias dentro da escassa bibliografia existente.

Depois do primeiro relato da doença, no Vale do Sacramento, esta foi assinalada na Inglaterra por Davies em 1942 segundo ARMSTRONG e ARMSTRONG (1964 b), na Califórnia do Sul por ARMSTRONG e ARMSTRONG (1963) e, finalmente, no Brasil, por CARDOSO, KIMATI e FERNANDES (1966).

KENDRICK e SNYDER (1942) estudaram o agente da doença sob o aspecto morfológico, identificando-o como Fusarium oxysporum Schl. e, em testes de patogenicidade, observaram ser êste uma forma específica para Phaseolus vulgaris L., a qual denominaram phaseoli. Observaram, ainda, que esse Fusarium não causava murcha aos seguintes vegetais: feijão de lima (P. limensis var. limenanus), "cowpea" (Vigna sinen-

sis) e soja (Soja max).

KENDRICK (1942) evidenciou que o Fusarium causador de murcha de feijoeiro pode ser transportado na superfície das sementes e que a deposição dos esporos na casca destas está sujeita à operação de colheita. Isto talvez possa explicar os resultados de ARMSTRONG e ARMSTRONG (1963), que compararam isolamentos de Fusarium provenientes da Califórnia com outros da Carolina do Sul, não encontrando diferenças na patogenicidade. Os próprios autores lembram que o campo de cultura da Carolina do Sul, onde havia ocorrido a murcha, tinha sido formado com sementes produzidas na Califórnia. Possivelmente, ocorreu uma introdução de Fusarium junto com a semente, da Califórnia para a Carolina do Sul.

Quanto à variabilidade do agente, ARMSTRONG e ARMSTRONG (1964 b), citam que Davies, na Inglaterra, relatou que isolamentos feitos de P.coccineus não apresentavam patogenicidade para P.vulgaris. Entretanto, ARMSTRONG e ARMSTRONG (1964 b) estudaram o comportamento de isolamentos de Fusarium feitos de material de P.vulgaris da Califórnia e da Carolina do Sul e de P.coccineus da Inglaterra. Estes isolamentos foram testados em 7 variedades suscetíveis e uma resistente de P.vulgaris e uma variedade de P.coccineus, não havendo nenhuma diferença no comportamento dos isolamentos para esses hospedeiros; todos foram igualmente patogênicos para as mesmas variedades.

ARMSTRONG e ARMSTRONG (1964 a, b), demonstraram que o Fusarium, agente da murcha do feijoeiro, não é específico para esta espécie, pois é capaz de causar sintomas internos de descoloração dos vasos em 2 variedades de "cowpea" e sintomas internos e de murcha em Lupinus luleus e Lupinus

albus.

Por sua vez, o feijoeiro pode ser infectado por outras formas de Fusarium oxysporum que não a forma phaseoli, ocorrendo a murcha. Assim, ARMSTRONG e ARMSTRONG (1963) relatam que um isolamento feito de feijoeiro, que apresentava sintoma típico de murcha, quando testado no próprio feijoeiro, revelou-se não patogênico a esta espécie, mostrando-se, entretanto, patogênico à variedade diferencial da raça 2 do Fusarium do "cowpea". No mesmo trabalho, os autores inocularam feijoeiro com isolamentos das raças 1 e 2 de "cowpea" e não obtiveram doença com nenhum dos isolamentos da raça 2, mas dois isolamentos da raça 1 revelaram-se altamente patogênicos ao feijoeiro. Fizeram, ainda, inoculações com isolamentos de Fusarium, que causam murcha em diferentes espécies vegetais, não obtendo nenhum resultado positivo em feijoeiro.

Não se encontrou na literatura nenhum método de trabalho que fôsse específico para o fungo objeto deste trabalho; de modo geral os autores se utilizam de métodos aplicados a outros Fusarium oxysporum.

ARMSTRONG e ARMSTRONG (1938) descrevem um método para teste de patogenicidade com fungos da espécie Fusarium oxysporum, utilizando hospedeiros cultivados em areia lavada, irrigada com solução nutritiva. O inóculo é obtido cultivando-se o fungo em solução nutritiva, de formulação igual à que la usada para os hospedeiros, mas com o dobro da concentração dos sais e acrescida de 2% de glucose. A inoculação é feita despejando-se um determinado volume de inóculo em sulco escavado ao redor do sistema radicular.

WELMAN (1939) estabeleceu o método atualmente conhecido por imersão para estudos da murcha do tomateiro, o

qual consiste em se cultivar inicialmente o hospedeiro em solo estéril. Quando as plantinhas atingem um tamanho adequado, são transplantadas para os vasos e, durante o transplante, faz-se a inoculação, mergulhando-se o sistema radicular numa suspensão de inóculo de Fusarium.

Com referência à eficiência dos métodos de inoculação, BALMER (1967), trabalhando com Fusarium, agente da murcha do algodão, relata que o método de imersão é mais eficiente em causar doença que o de Armstrong, e que o efeito das concentrações diferentes de inóculo só puderam ser detectadas pelo método de Armstrong, não tendo sido possível analisar estatisticamente os efeitos dos tratamentos no método de imersão, devido à grande severidade com que a doença ocorreu, mesmo nas menores concentrações de inóculo.

A conservação de fungos da espécie F.oxysporum descrita por MC KEEN e WENSLEY (1961) consiste em obter culturas de fungos desta espécie em tubos contendo solo arenoso mais 10% de esterco como meio, conservando-as a uma temperatura de 3 a 4°C.

### 3. MATERIAL

#### 3.1 Patógeno

Trabalhou-se com 3 diferentes isolamentos de Fusarium, provenientes de 3 regiões geográficas distintas do Estado de São Paulo e obtidos de duas variedades de feijão. Os isolamentos usados são os relacionados abaixo.

Isolamentos	Região	Hospedeiro
3700	Laranjal Paulista	Feijão-sêco (Rosinha)
5800	Santo Amaro	Feijão-vagem (Comum)
6400	Pedro Toledo	Feijão-vagem (Comum)

### 3.2 Hospedeiro

Nos testes para estudo do método de inoculação usaram-se apenas variedades de feijão-sêco e nos estudos sobre o comportamento de diferentes isolamentos usaram-se variedades de feijão-sêco e feijão-vagem. As sementes das variedades de feijão-sêco, usadas neste trabalho, foram obtidas no ano anterior, nos campos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e conservados em câmaras secas apropriadas. As sementes de feijão-vagem foram obtidas diretamente de lavradores.

As variedades de P. vulgaris usadas encontram-se abaixo relacionadas.

Nº de Identificação	Nome das Variedades	Grupo	Origem
1000	Preto 60 Dias	Preto	Minas Gerais
4000	Rosa (PE)	Rosinha	Pernambuco
4004	Rosinha 1336	Rosinha	Minas Gerais
6000	Chato Mineiro nº 34	Bico de Ouro	Pernambuco
6003	Feijão nº 29-30-L.50	Bico de Ouro	São Paulo
s/n	Vagem Manteiga	Vagem (Branco)	São Paulo

### 3.3 Substrato para o cultivo do hospedeiro e condições ambientais.

Em todos os experimentos cultivou-se o hospedeiro em vasos de barro com 20 cm de diâmetro superior e 19,5 cm de altura, contendo areia lavada, de rio, irrigada semanalmente com solução nutritiva. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação, com temperatura controlada entre 28 e 30°C.

Os vasos e a areia foram esterilizados em autoclave, por 2 horas, sob uma pressão de 0,5 atmosferas e uma temperatura de 110°C.

A solução nutritiva usada no experimento I foi a 2ª fórmula comercial de MALAVOLTA e HAAG (1964). Para os demais experimentos substituiu-se o nitrato de potássio daquela fórmula por nitrato duplo de sódio e potássio, na base de 5,50 g deste adubo por litro de solução.

### 3.4 Meios de cultura para o cultivo do patógeno e condições ambientais.

Para o isolamento e a purificação do patógeno, proveniente de material do campo, usou-se meio de maltose (4 gr/l)-peptona (2 gr/l) - Agar (20 gr/l) e água (MPA). A conservação das culturas obtidas foi feita em meio de solo com 20% de matéria orgânica, contidas em tubos de ensaio.

Na obtenção do inóculo, para todos os experimentos, utilizou-se meio de cultura feito com a solução nutritiva usada para o hospedeiro, na mesma concentração e acrescida de 2% de sacarose.

Nos reisolamentos efetuados durante os testes usou-se meio de agar (20 gr/l) e água (AA).



Todos os meios foram esterilizados em autoclave, por 30 minutos, a uma temperatura de 110-120°C e pressão de 0,5-1,0 atmosfera.

O cultivo dos fungos foi feito sempre em estufa, com a temperatura regulada para 28°C.

#### 4. MÉTODOS

##### 4.1 Tratamento das sementes, semeadura e obtenção de mudas.

As sementes, após rigorosa seleção, foram desinfetadas, mergulhando-as em uma solução de hipoclorito de sódio diluído (1 parte de hipoclorito comercial, contendo 5% de cloro-ativo, e 1 parte de água) pelo tempo de 30 minutos. Decorrido êsse prazo, o hipoclorito foi substituído por água e nesta as sementes foram deixadas imersas por 24 horas e então semeadas.

A semeadura sempre foi feita a uma profundidade de 2 cm em areia lavada, esterilizada e previamente regada com água de torneira. Nos três primeiros dias após a semeadura não se fez nenhuma rega, começando as mesmas com água de torneira no quarto dia e no sétimo dia fazia-se a primeira aplicação de solução nutritiva.

Na obtenção de mudas a serem inoculadas pelo método de Armstrong, a semeadura foi feita diretamente nos vasos que constituíram as parcelas do experimento, distribuindo-se as sementes em um círculo de 14 cm de diâmetro, em quantidade igual a 50% a mais do que o número de mudas desejadas por parcela. Seis dias após a semeadura fazia-se o desbaste das

plantas em excesso, deixando-se apenas as 10 mais homogêneas por vaso.

Para a aplicação do método de inoculação por imersão a sementeira foi feita em caixas de madeira, previamente esterilizadas em autoclave, que mediam 43 X 32 X 10 cm de altura. Nestas, as sementes foram distribuídas em 5 linhas paralelas à maior dimensão da caixa, numa densidade de 15 a 17 sementes por linha. Também neste caso, usou-se um número de sementes 50% superior ao número de mudas desejado. Para a inoculação foram usadas mudas com 7 dias de idade.

#### 4.2 Métodos de Inoculação

O método de inoculação de Armstrong constituiu-se em colocar o inóculo diretamente no substrato, onde o hospedeiro se desenvolve, junto às raízes deste, previamente feridas. Com um tubo de vidro, com o diâmetro ligeiramente menor que o do círculo formado pelas plantas, pressionava-se a areia úmida do centro do vaso, até uma profundidade de aproximadamente 10 cm. Com esta operação conseguiam-se os ferimentos desejados no sistema radicular do hospedeiro e também remover um volume de areia igual ao do cilindro de vidro. Neste poço, assim aberto no centro do vaso, despejavam-se 300 ml do inóculo na concentração desejada e, imediatamente em seguida, tapava-se o poço com a mesma areia que fora removida.

No processo de inoculação por imersão as plantas com 7 dias após a sementeira, eram retiradas das caixas onde foram produzidas, e, por agitação, retirava-se o excesso de areia aderente ao sistema radicular, o qual, em seguida, era

mergulhado em 300 ml do inóculo na concentração desejada. A seguir, as plantas assim tratadas eram replantadas em círculo, com cerca de 14 cm de diâmetro, nos vasos contendo areia lavada e autoclavada, e regadas com o que sobrasse daquele volume de inóculo.

O isolamento das culturas classificadas como 3700 e 5800 seguiram a seguinte marcha: os materiais de feijão-sêco e feijão-vagem, respectivamente, foram trazidos do campo e, em laboratório, as hastes com bastante sintomas internos na região dos vasos foram selecionadas e desinfetadas superficialmente, por flambagem. A casca foi removida e um pequeno pedaço de tecido foi retirado da região dos vasos e transferido para meio esterilizado de MPA. A cultura 6400 foi fornecida por gentileza do Eng<sup>o</sup>Agr<sup>o</sup> T. Namekata, que a isolou nos laboratórios do Instituto Biológico de São Paulo.

Quando necessário, as culturas foram purificadas em meio de MPA, e, então, conservadas em meio de solo à temperatura ambiente.

O reisolamento se fez a partir de hastes de plantas mortas ou que mostrassem sintomas externos durante os experimentos. Hastes colhidas durante o experimento eram subdivididas em pedaços de 1,0 cm, desinfetadas superficialmente com hipoclorito de sódio (formulação comercial contendo 5% de cloro-ativo) diluído na base de 1 parte deste para 2 de água, pelo tempo aproximado de 1 minuto, e então eram colocadas em caixas de Petri contendo AA.

#### 4.4: Obtenção e diluição do inóculo

Sempre que se preparava o inóculo, partia-se da cultura em meio de solo, a qual era repicada para caixas de Petri contendo meio de MPA, neste se permitia a formação de uma pequena colônia por cerca de três dias, a qual era, então, repicada para tubos de ensaio contendo meio de MPA inclinado. Nestes tubos deixava-se desenvolver uma colônia por 5 a 7 dias a fim de se obter grande quantidade de esporos.

Finalmente, fazia-se uma suspensão de esporos com água esterilizada, nos próprios tubos de cultura, e transferia-se 1 ml desta suspensão para frascos de Erlenmeyer com capacidade de 3,0 litros, contendo 1 litro do meio de solução nutritiva, devidamente esterilizado. Permitia-se o desenvolvimento do fungo por 7 dias. Esta cultura em meio líquido, além de ser mantida durante aquêle período em temperatura de 28°C, era agitada, manualmente, três vêzes por dia.

Considerou-se inóculo concentrado (N) aquêle obtido após se passar por liquidificador a cultura obtida como a cima descrito. Aliquotas desta suspensão eram, então, diluídas com solução nutritiva, a fim de se obter a concentração desejada.

Durante a operação de inoculação, o inóculo era mantido em constante agitação, por meio de um agitador de hélice.

#### 4.6 Método de avaliação

A avaliação da severidade da doença baseou-se no número de plantas mortas por parcela.

A computação dêsse número, obtido de cada parcela, foi feita segundo dois métodos diferentes. No primeiro, a-

plicado ao experimento I, calculou-se a porcentagem de plantas mortas por parcela, e esta foi transformada em arco-seno.

No segundo caso, aplicado aos experimentos I, II e IV calculou-se um índice semelhante ao que CASTILHO e outros (1965) determinaram para o estudo dos defeitos do café, ao qual se denominou índice de resistência.

O índice de resistência consiste na raiz quadrada de uma média ponderada, considerando-se o número de plantas mortas e tomando-se como peso o valor do período, multiplicado por 100.

$$\text{índice de resistência} = \sqrt{\frac{\sum x \cdot y}{\sum y}} 100$$

Onde:

x = número de plantas mortas dentro do período de valor y

y = valor do período no qual se colheu o número x de plantas mortas.

O valor y dos períodos foi considerado do seguinte modo: para o período no qual se coletou a primeira planta morta o valor de y = 1, para o segundo período onde se coletou plantas mortas y = 2, e assim por diante.

No experimento I, considerou-se um período igual ao espaço de 3 dias e, neste caso, computaram-se os resultados durante 6 períodos. Para os experimentos II e IV cada dia foi um período e o total destes foi de 20 períodos.

Multiplicou-se a média ponderada por 100 apenas para se trabalhar com números inteiros.

Exemplificando a determinação do índice de resistência de uma parcela, suponha-se que nesta parcela existiam 5 plantas que morreram dentro dos seguintes períodos: 1 plan

ta no 3º período, 2 plantas no 5º período e as duas restantes não morreram. Neste experimento se considerariam 10 períodos e teríamos, então, que o valor de  $y$  para o 3º período = 3, do 5º período  $y = 5$ , o do 10º período  $y = 10$ . Os valores obtidos de plantas mortas dentro de cada período seria: 3º período  $x.y = 3$ , no 5º período  $x.y = 10$  e no 10º período  $x.y = 20$ . Portanto  $\sum x.y = 33$ ;  $\sum y = 55$ , logo o índice de resistência dessa parcela seria =  $\sqrt{\frac{33}{55} 100}$

#### 4.7 Estudo do efeito do método de inoculação, idade e variedade do hospedeiro, concentração do inóculo e método de avaliação - Experimento I

Para esse estudo, foram inoculadas plantas de feijão-sêco das variedades 1000, 4000 e 6000, em 3 idades diferentes: 7, 12 e 17 dias, a contar da data da semeadura, pelo método de Armstrong e plantas das mesmas variedades, com 7 dias, pelo método de imersão. Usaram-se três diferentes concentrações de inóculo: N/2, N/100 e N/200 do isolamento 3700, totalizando-se 36 tratamentos repetidos 4 vezes, sendo o delineamento em blocos inteiramente casualizados.

Cada parcela do experimento era constituída de 10 plantas.

O método de avaliação empregado foi o de porcentagem de plantas mortas no fim do experimento, tanto para as plantas inoculadas pelo método de Armstrong como pelo de imersão. Ao método de imersão aplicou-se o índice de resistência, em análise à parte.

#### 4.8 Estudo do efeito das concentrações de inóculo, variedade do hospedeiro e confirmação do índice de resis-

## tência - Experimento II

Estudou-se o comportamento de três variedades de feijão-sêco 1000, 4004 e 6000, inoculadas com 9 diferentes concentrações N/25, N/50, N/75, N/100, N/250, N/500, N/750, N/1000 e N/2500. O inóculo foi obtido do isolamento 3700 e inoculado pelo método de imersão, totalizando-se 27 tratamentos repetidos 4 vezes e distribuídos em blocos inteiramente casualizados, contendo cada parcela 10 plantas.

O método de avaliação usado foi o do índice de resistência.

### 4.9 Estudo da variabilidade do patógeno "in vitro" - Experimento III

Neste experimento estudou-se o comportamento dos 3 isolamentos, 3700, 5800 e 6400 em três diferentes meios de cultura MPA, BDA e Martin, em placas de Petri.

O transplante dos isolamentos para aqueles meios foi feito de colônias obtidas em MPA, com o auxílio de uma alça de tungstênio, de diâmetro constante, tendo-se feito 5 repetições para cada isolamento, em cada meio de cultura.

Comparou-se, então, após um período de 5 dias no qual as placas foram mantidas à temperatura de 28°C, a cor e formação de micélio aéreo das colônias obtidas.

### 4.10 Estudo do efeito de diferentes isolamentos em diferentes concentrações de inóculo e em diversas variedades do hospedeiro - Experimento IV

Plantas das variedades 1000 e 6003 de feijão-sêco foram inoculadas, pelo método de imersão, com três diferen-

tes concentrações de inóculo, N/50, N/300 e N/550, obtidas dos isolamentos 3700, 5800 e 6400 enquanto que plantas da variedade Manteiga de feijão-vagem foram inoculadas com apenas as concentrações N/50 e N/550 dos inóculos acima descritos, totalizando 24 tratamentos que foram repetidos 4 vezes, possuindo cada parcela 10 plantas e delineados em blocos inteiramente casualizados.

A avaliação foi feita através do índice de resistência.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Resultados do Experimento I - Estudo do efeito do Método de Inoculação, idade e variedade do hospedeiro, concentração de inóculo e método de avaliação.

Observou-se, neste experimento, que o prazo decorrido entre a data da inoculação e a morte da primeira planta foi de 8 dias.

Os resultados, sob forma de porcentagem de plantas mortas, transformados em arco-seno, foram colhidos durante um período de 24 dias, iniciado na data em que se coletou a primeira planta morta, encontram-se no quadro I. Destes resultados, foi possível, analisar apenas, aqueles obtidos nos tratamentos inoculados pelo método de Armstrong, com as seguintes concentrações de inóculo N/100 e N/200, devido a não se ter observado variação entre as repetições tratadas por imersão e, em algumas repetições, dos tratamentos inoculados com a maior concentração de inóculo pelo método de Armstrong. A análise de variância encontra-se no quadro II.



A aplicação do índice de resistência aos tratamentos inoculados pelo método de imersão encontra-se no quadro III e a sua análise de variância no quadro IV.

Fêz-se o reisolamento do patógeno para todas as plantas mortas, conseguindo-se sucesso em 95% dos casos.

Praticamente, todas as plantas mortas ou com sintomas externos mostraram, também, o sintoma interno de descolg<sub>ra</sub>ção de vasos.

QUADRO I - Porcentagem de plantas mortas, por parcela, transformadas em arco-seno, para tratamentos constituídos de três variedades inoculadas em uma idade, pelo método de imersão, e em três idades, pelo método de Armstrong, com 3 diferentes concentrações de inóculo.

Método de ino- lação	Idade do hos- peiro	Concen- tração do inó- culo	VARIETADES																
			1000			4000			6000										
			1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª					
Imersão	7 dias	N/2	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	
		N/100	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00
		N/200	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00
	12 dias	N/2	70,45	90,00	70,45	50,77	90,00	71,56	71,56	90,00	71,56	71,56	90,00	90,00	90,00	90,00	71,56	90,00	90,00
		N/100	37,76	45,00	50,77	50,77	39,23	56,79	56,79	56,79	56,79	56,79	56,79	71,56	56,79	56,79	56,79	56,79	56,79
		N/200	45,00	41,78	58,03	71,56	71,56	90,00	45,00	45,00	28,11	63,44	63,44	63,44	63,44	63,44	63,44	63,44	45,00
Arm- strong	12 dias	N/2	71,56	90,00	71,56	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	71,56	90,00	90,00	
		N/100	45,00	50,77	33,21	39,23	90,00	90,00	71,56	48,16	90,00	90,00	50,77	39,23	39,23	39,23	39,23	39,23	
		N/200	45,00	45,00	35,18	39,23	71,56	63,44	28,11	45,00	90,00	90,00	50,77	39,23	39,23	39,23	39,23	39,23	
	17 dias	N/2	90,00	56,79	71,56	90,00	90,00	90,00	56,79	90,00	90,00	90,00	71,56	90,00	90,00	71,56	90,00	90,00	
		N/100	50,77	63,44	50,77	33,21	71,56	63,44	39,23	50,77	63,44	39,23	50,77	63,44	71,56	71,56	33,21	33,21	
		N/200	50,77	45,00	26,56	39,23	71,56	71,56	71,56	56,79	56,79	56,79	56,79	56,79	56,79	56,79	56,79	56,79	

a = parcela perdida estimada

QUADRO II - Análise de variância para os efeitos de concentração de inóculo, idade e variedade do hospedeiro, inoculado pelo método de Armstrong e avaliados sob forma de porcentagem de plantas mortas.

Causa da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Blocos	3	4.336,6588		
Tratamentos	17	7.630,2974	448,8410	2,46 *
Idade (I)	2	103,9289	51,9644	0,286
Concentração	1	3,2667	3,2667	0,018
Variedade (V)	2	4.751,2833	2.375,6416	13,06 **
I X C	2	632,3148	316,1552	1,74
I X V	4	759,7385	189,9346	1,04
C X V	2	95,3814	47,6907	0,262
I X C X V	4	1.284,3811	321,0952	1,76
Erro	50	9.094,9304	181,8986	
Total	70	21.061,8866		

C.V. = 23,74 %

Pela análise de variância, observou-se um efeito significativo, ao nível de 1% de probabilidade, para variedades, não se tendo notado nenhum efeito significativo entre idades, concentrações e nas demais interações.

As médias para variedades obtidas foram as seguintes:

$$\bar{M}_{1000} = 45,54$$

$$\bar{M}_{4000} = 60,35$$

$$\bar{M}_{6000} = 64,45$$

As diferenças mínimas significativas no teste Tukey foram as seguintes:  $\Delta 5\% = 9,35$  e  $\Delta 1\% = 11,77$ .

Êste teste revelou que a média da variedade 1000 se diferencia significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, das médias das variedades 4000 e 6000, as quais não mostraram diferença entre si.

QUADRO III - Índice de resistência, por parcela, para tratamentos constituídos de três variedades inoculadas em uma idade pelo método de imersão, com três concentrações de inóculo.

Variedades	Repetições	Concentrações do inóculo		
		N/2	N/100	N/200
1000	1ª	9,257	11,928	13,092
	2ª	9,513	12,907	9,757
	3ª	8,728	11,752	13,623
	4ª	10,686	13,270	13,274
4000	1ª	7,556	10,464	11,950
	2ª	6,899	9,513	10,909
	3ª	9,000	10,686	11,126
	4ª	10,464	13,450	13,092
6000	1ª	9,757	10,237	11,340
	2ª	8,451	10,464	11,336
	3ª	9,757	11,126	11,340
	4ª	10,464	11,949	11,949

QUADRO IV - Análise de variância para os efeitos de concentração de inóculo e variedade de hospedeiro, inoculado pelo método de imersão, avaliado sob forma de índice de resistência.

Causa da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Blocos	3	20,752570		
Tratamentos	8	61,124150	7,640518	11,52 **
Variedade (V)	2	7,414004	3,707002	5,59 *
Concentração (C)	2	50,179817	25,089908	37,82 **
V X C	4	3,530329	0,882582	1,33
Erro	24	15,920552	0,663356	
Total	35	97,797272		

C.V. = 7,494 %

A análise de variância mostrou um efeito significativo ao nível de 5% de probabilidade, para variedades e, ao nível de 1% de probabilidade, para concentração de inóculo, não mostrando diferença significativa para a interação variedade-concentração.

As médias para variedades foram as seguintes:

$$\bar{M}_{1000} = 11,482$$

$$\bar{M}_{6000} = 10,681$$

$$\bar{M}_{4000} = 10,426$$

As médias para concentrações de inóculo foram:

$$\bar{M}_{N/200} = 11,899$$

$$\bar{M}_{N/100} = 11,479$$

$$\bar{M}_{N/2} = 9,211$$

As diferenças mínimas significativas do teste Tukey, tanto para variedades como para concentrações de inó-

culo, foram as seguintes:  $\Delta$  5% = 0,239 e  $\Delta$  1% = 0,308. Este teste mostrou que as três variedades diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, e que a variedade 1000 difere das variedades 4000 e 6000, ao nível de 1% de probabilidade. As concentrações de inóculo mostraram-se tôdas três diferentes entre si, ao nível de 1% de probabilidade.

### 5.2 Resultados do Experimento II - Estudo do efeito das concentrações de inóculo, variedade de hospedeiro e confirmação do índice de resistência.

O prazo observado entre a data da inoculação e a morte da primeira planta foi de 8 dias.

Os resultados foram avaliados sob a forma de índice de resistência e encontram-se relacionados no quadro V. A análise de variância encontra-se no quadro VI.

O exame da região vascular das plantas mortas revelou sempre a presença de sintomas internos da doença. Fez-se o reisolamento de 10% das plantas mortas e, em todos os casos, obteve-se o Fusarium.

QUADRO V - Índice de Resistência, por parcela, para tratamentos constituídos de três variedades, inoculadas pelo método de imersão, com nove diferentes concentrações de inóculo.

Concentrações de inóculo	VARIEDADES											
	1000			4004			6000			Repetições		
	1ª	2ª	3ª	4ª	1ª	2ª	3ª	4ª	1ª	2ª	3ª	4ª
N/25	4,02	5,02	7,00	4,47	3,45	6,69	6,55	4,31	2,67	3,84	4,58	3,16
N/50	6,97	5,21	5,73	5,02	6,06	3,16	5,56	7,04	5,94	3,59	4,20	3,24
N/75	5,98	6,90	9,38	4,42	6,29	7,59	7,20	3,59	4,20	5,69	7,17	3,52
N/100	4,98	7,72	8,08	4,02	6,80	7,56	7,87	3,52	4,78	6,97	7,90	4,58
N/250	9,00	7,59	7,37	5,35	8,28	5,56	7,62	4,53	6,833	5,30	5,39	3,96
N/500	9,28	6,72	8,11	7,93	7,62	6,65	7,99	6,58	6,25	6,02	7,07	4,88
N/750	8,37	9,51	9,76	7,14	8,39	9,41	9,66	6,73	6,73	9,76	9,44	4,88
N/1000	9,54	9,23	9,61	7,56	8,31	9,49	9,46	7,87	5,21	9,66	9,76	5,69
N/2500	9,13	8,97	9,76	8,73	8,97	8,67	9,54	6,58	7,75	9,18	9,10	6,29

QUADRO VI - Análise de variância para os efeitos de concentração de inóculo e variedades de hospedeiros, inoculados pelo método de imersão, e avaliados sob forma de índice de resistência.

Causa da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Blocos	3	83,3692		
Tratamentos	26	242,1417	9,31314	7,52 **
Variedades (V)	2	35,1009	17,5504	14,17 **
Concentrações (C)	8	200,1903	25,0237	20,21 **
V X C	16	6,8505	0,4281	0,346
Erro	78	96,5845	1,2382	
Total	107	422,0954		

C.V. = 16,675 %

A análise de variância mostrou diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade, entre as variedades e entre as concentrações, não mostrou, entretanto, diferença significativa para a interação variedade-concentração.

As médias para as variedades foram as seguintes:

$$\bar{M}_{1000} = 7,322$$

$$\bar{M}_{4004} = 6,98$$

$$\bar{M}_{6000} = 5,98$$

As diferenças mínimas significativas para variedades, no teste Tukey, foram as seguintes:  $\Delta 5\% = 0,63$  e  $\Delta 1\% = 0,79$ . Este teste revelou que a variedade 6000 se diferencia significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, das variedades 1000 e 4004, as quais não se diferenciam entre si.

As médias das concentrações foram:



$\bar{M}_{N/2500} = 8,55$	$\bar{M}_{N/500} = 7,09$	$\bar{M}_{N/75} = 5,99$
$\bar{M}_{N/1000} = 8,45$	$\bar{M}_{N/250} = 6,40$	$\bar{M}_{N/50} = 5,14$
$\bar{M}_{N/750} = 8,31$	$\bar{M}_{N/100} = 6,23$	$\bar{M}_{N/25} = 4,65$

As diferenças mínimas significativas encontradas no teste Tukey, para concentrações foram:  $\Delta 5\% = 1,54$  e  $\Delta 1\% = 1,80$ . As diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade, encontradas foram N/25 e N/50 diferiram de N/500; N/75, N/100 e N/250 diferiram de N/750.

### 5.3 Resultados do Experimento III - Estudo da variabilidade do patógeno "in vitro".

Neste experimento, observou-se que as colônias dos isolamentos 3700, 5800 e 6400, desenvolvidas nos meios de cultura MPA e de Martin não mostraram diferenças entre si.

No meio de BDA notou-se que as culturas 5800 e 6400 apresentavam uma pigmentação de cor de vinho e o micélio aéreo era pouco abundante, quando comparado com aquele formado na cultura 3700, a qual, neste mesmo meio, se mostrou completamente branca.

### 5.4 Resultados do Experimento IV - Estudo do efeito de diferentes isolamentos, em diferentes concentrações de inóculo, e diversas variedades do hospedeiro.

Também neste experimento, o prazo observado entre a data de inoculação e o dia em que se coletou a primeira planta morta foi de 8 dias.

As plantas do tratamento variedade Manteiga, ino-

culadas com o isolamento 3700, não mostraram sintomas. No final do experimento tentou-se reisolar o fungo de tais plantas, não se obtendo sucesso em nenhum caso.

Nos demais tratamentos os sintomas da doença foram observados e se fez o reisolamento em 10% do total de plantas mortas, tendo-se obtido sucesso em todas as tentativas. A comparação das culturas originais com os reisolamentos, em BDA, mostrou que estas eram semelhantes às primeiras.

O isolamento 3700 mostrou-se patogênico às variedades 1000 e 6003, não o sendo para a variedade Manteiga. Os isolamentos 5800 e 6400 causaram doença em todas as variedades.

Os resultados deste experimento encontram-se no quadro VII. Fizeram-se duas análises estatísticas, a primeira, na qual se computaram os seguintes tratamentos: variedades 1000 e 6003, inoculadas com tres isolamentos em três diferentes concentrações de inóculo, que se encontra nos quadros VIII IX, X e XI. A segunda, na qual se computaram os tratamentos representados pelas três variedades inoculadas com os isolamentos 5800 e 6400, em duas concentrações de inóculo (N/50 e N/550), que se encontra nos quadros XII, XIII e XIV.

QUADRO VII - Índice de resistência, por parcela, para tratamentos constituídos por 3 variedades inoculadas pelo método de imersão com diferentes isolamentos, em diferentes concentrações de inóculo

ISO la- men to	Con- cen- tra- ção	VARIEDADES											
		1000			6003			Manteiga			repetições		
		1ª	2ª	3ª	4ª	1ª	2ª	3ª	4ª	1ª	2ª	3ª	4ª
N/50	4,254	4,473	4,578	3,236	3,964	3,652	3,716	9,759	9,759	9,759	9,759	9,759	9,759
3700	N/300	5,976	5,732	6,248	5,023	4,525	5,774	---	---	---	---	---	---
N/550	6,583	6,248	6,510	7,496	5,210	5,855	6,474	4,680	9,759	9,759	9,759	9,759	9,759
N/50	5,210	6,399	7,237	5,255	8,619	6,546	8,106	7,104	7,776	7,590	6,831	9,284	---
5800	N/300	7,898	9,207	8,891	8,674	8,136	8,395	9,436	9,335	---	---	---	---
N/550	9,129	9,180	6,969	9,436	9,759	9,023	8,646	9,050	9,512	9,411	9,636	9,386	---
N/50	7,335	6,399	6,211	7,368	6,325	5,520	5,892	4,976	8,674	8,999	9,023	8,047	---
6400	N/300	6,797	6,399	6,900	8,563	4,731	6,546	5,732	5,210	---	---	---	---
N/550	8,917	7,400	8,136	8,309	6,969	6,726	6,133	7,238	9,759	9,759	8,997	9,710	---

QUADRO VIII - Análise de variância para os efeitos de duas variedades inoculadas com tres diferentes isolamentos e em três diferentes concentrações, avaliado sob forma de índice de resistência.

Causa da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Blocos	3	0,281796		
Tratamentos	17	176,508966	10,382880	20,29 **
Variedades (V)	1	3,826300	3,826300	7,48 **
Concentração (C)	2	41,560817	20,780408	40,60 **
Isolamento (I)	2	106,398843	53,199421	103,95 **
V X C	2	1,998009	0,999004	1,95
I X C	4	7,642077	1,910519	3,73 *
V X I	2	14,009435	7,004717	13,69 **
I X C X V	4	1,273485	0,318371	0,62
Erro	51	26,101119	0,511786	
Total	71	202,891881		

C.V. = 10,71 %

As médias observadas para variedades foram as seguintes:  $\bar{M}_{1000} = 6,905$  e  $\bar{M}_{6003} = 6,444$ . As diferenças mínimas significativas calculadas para o teste de Tukey foram  $\Delta 5\% = 0,341$  e  $\Delta 1\% = 0,455$ . Comparando-se as duas médias, pôde-se observar uma diferença entre elas, ao nível de 1% de probabilidade.

As diferenças mínimas significativas, encontradas para os efeitos de concentração e de isolamento, no teste de Tukey, foram as seguintes:  $\Delta 5\% = 0,502$  e  $\Delta 1\% = 0,637$ . As médias das concentrações foram as referidas abaixo:

$$\bar{M}_{N/50} = 5,668$$

$$\bar{M}_{N/300} = 6,852$$

$$\bar{M}_{N/550} = 7,503$$

Estas médias diferiram, entre si, ao nível de 1% de probabilidade.

As médias dos isolamentos foram as seguintes:

$$\bar{M}_{5800} = 8,152$$

$$\bar{M}_{6400} = 6,697$$

$$\bar{M}_{3700} = 5,174$$

Comparando estas médias dos isolamentos, observou-se que elas diferem entre si, ao nível de 1% de probabilidade.

Desdobrando-se os graus de liberdade obtidos para a interação Isolamento X Concentração, para o estudo dos efeitos de isolamentos dentro de concentrações, obteve-se a análise apresentada no quadro IX.

QUADRO IX - Análise de variância para o efeito de isolamento dentro de concentração.

Causa da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
3700 dentro de C	2	20,121782	10,060891	19,66 **
5800 dentro de C	2	21,709962	10,854981	21,21 **
6400 dentro de C	2	7,371151	5,685575	11,11 **
Erro	51	26,101119	0,511786	

As médias dos isolamentos dentro das concentrações encontram-se relacionadas abaixo. As diferenças mínimas significativas no teste de Tukey foram  $\Delta_{5\%} = 0,87$  e  $\Delta_{1\%} = 1,10$ .

Isolamentos	Concentrações		
	N/50	N/300	N/550
3700	3,940	5,450	6,132
5800	6,809	8,746	8,899
6400	6,253	6,359	7,478

Comparando-se as médias de cada variedade, dentro de cada concentração, nota-se que para os isolamentos 3700 e 5800 as médias na concentração N/50 diferiram significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, das outras duas, as quais não diferiram entre si em ambos os casos. A média do isolamento 6400, dentro da concentração N/550, diferiu significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, das encontradas dentro das concentrações N/50 e N/300, as quais não diferiram entre si.

Desdobrando-se os graus de liberdade obtidos para a interação Isolamento X Variedades, para os estudos dos efeitos de isolamento dentro de variedades, obteve-se a análise apresentada no quadro XI. Para os efeitos de variedades dentro de isolamentos, a análise encontra-se no quadro XII.

QUADRO XI - Análise de variância do efeito isolamento dentro de variedades.

Causa da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
3700 dentro de V	1	3,033126	3,033126	5,93 *
5800 dentro de V	1	3,132038	3,132038	6,12 *
6400 dentro de V	1	11,670571	11,670571	22,80 **
Erro	51	26,101119	0,511786	

As médias dos isolamentos dentro das variedades encontram-se relacionadas abaixo. As diferenças mínimas significativas, no teste de Tukey, foram:  $\Delta$  5% = 0,469 e  $\Delta$  1% = 0,627.

Isola- mentos	VARIEDADES	
	1000	6003
3700	5,529	4,818
5800	7,790	8,512
6400	7,394	5,999

Em todos os três casos, as médias dos isolamentos dentro de cada variedade diferiram entre si, ao nível de 1% de probabilidade.

QUADRO XII - Análise de variância do efeito variedade dentro de isolamento.

Causa da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
1000 dentro de I	2	34,978625	17,489312	34,17 **
6003 dentro de I	2	85,423652	42,711826	83,46 **
Êrro	51	26,101119	0,511786	

As médias das variedades dentro dos isolamentos encontram-se relacionadas abaixo. As diferenças mínimas significativas, no teste Tukey, são:  $\Delta$  5% = 0,564 e  $\Delta$  1% = 0,715.

Varie- dades	ISOLAMENTOS		
	3700	6400	5800
1000	5,529	7,394	7,790
6003	4,818	5,999	8,512

No caso da variedade 1000, sua média dentro do isolamento 3700 diferiu significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, daquelas obtidas dentro dos isolamentos 6400 e 5800, as quais não mostraram diferença entre si. Na variedade 6003 as médias de cada isolamento diferiram significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, das demais.

QUADRO XII - Análise de variância para os efeitos de três variedades inoculadas com dois diferentes isolamentos e em duas diferentes concentrações de inóculo, avaliadas sob a forma de índice de resistência.

Causa da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Blocos	3	1,847571		
Tratamentos	11	76,099229	6,918111	13,88 **
Variedades (V)	2	25,442025	12,721012	25,53 **
Concentrações (C)	1	27,700485	27,700485	55,59 **
Isolamentos (I)	1	3,137541	3,137541	6,30 *
V X C	2	1,439433	0,719716	1,44
V X I	2	15,965887	7,982943	16,02 **
I X C	1	2,040226	2,040226	4,09
I X C X V	2	0,373632	0,186816	0,37
Erro	33	16,442609	0,498260	
Total	47	94,389409		

C.V. = 8,95%

As diferenças mínimas significativas no teste Tukey, para o caso de variedades, foram  $\Delta$  5% = 0,612 e  $\Delta$  1% = 0,783. As médias das variedades foram as seguintes:



$$\bar{M}_{\text{Manteiga}} = 8,899$$

$$\bar{M}_{1000} = 7,430$$

$$\bar{M}_{6003} = 7,289$$

Por êste teste, a variedade Manteiga diferiu significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, das outras variedades, as quais não diferiram entre si.

As diferenças mínimas significativas no teste Tukey, no caso de concentrações e de isolamentos foram as seguintes:  $\Delta$  5% = 0,416 e  $\Delta$  1% = 0,560.

As médias obtidas para concentrações foram  $\bar{M}_{N/50} = 7,113$  e  $\bar{M}_{N/550} = 8,632$ , as quais diferiram entre si, ao nível de 1% de probabilidade.

As médias obtidas para isolamentos foram as seguintes:  $\bar{M}_{5800} = 8,128$  e  $\bar{M}_{6400} = 7,617$ . Estas duas médias diferiram significativamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade.

Desdobrando-se os graus de liberdade obtidos para a interação Variedade X Isolamento, para o estudo dos efeitos de variedade dentro de isolamentos, obteve-se a análise apresentada no quadro XIII e, análogamente, o estudo de isolamentos dentro de variedades se encontra no quadro XIV.

QUADRO XIII - Análise de variância para o efeito de variedade dentro de isolamento.

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
1000 dentro de I	I	0,099225	0,099225	0,20
6003 dentro de I	I	18,220093	18,220093	36,57 **
Mant. dentro de I	I	0,784111	0,784111	1,57
Erro	33	16,442609	0,498260	

A análise acima mostra que as variedades 1000 e Manteiga não se comportaram de maneira diferente dentro dos isolamentos 6400 e 5800, o mesmo não acontecendo, entretanto, com a variedade 6003. Para esta última variedade as médias encontradas foram  $\bar{M}_{5800} = 8,356$  e  $\bar{M}_{6400} = 6,222$ . As diferenças mínimas significativas para o teste Tukey foram  $\Delta 5\% = 0,866$  e  $\Delta 1\% = 1,108$ .

QUADRO XIV - Análise de variância para o efeito de isolamento dentro de variedade.

Causa da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
5800 dentro V	2	7,659294	3,82647	7,69 **
6400 dentro V	2	33,748616	16,873080	33,86 **
Erro	33	16,442609	0,498260	

As médias dos isolamentos dentro das variedades encontram-se relacionadas abaixo. As diferenças mínimas significativas no teste Tukey foram as seguintes:  $\Delta 5\% = 0,719$  e  $\Delta 1\% = 0,968$ .

Isolamentos	VARIEDADES		
	1000	6003	Mant.
5800	7,352	8,356	8,678
6400	7,509	6,222	9,120

Comparando as médias de cada isolamento dentro das variedades temos: a média do isolamento 5800 dentro da variedade 1000 diferiu significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, das médias deste isolamento dentro das variedades 6003 e Manteiga, as quais não diferiram entre si. dias do isolamento 6400, dentro de cada variedade, diferenci

aram-se das demais, ao nível de 1% de probabilidade.

## 6. DISCUSSÃO

No experimento I, os resultados obtidos mostraram que o método de inoculação por imersão é mais eficiente que o de Armstrong, confirmando os resultados obtidos por BALMER (1967), quando utilizou os dois métodos no estudo da murcha causada por Fusarium em algodoeiro.

A morte de tôdas as plantas inoculadas pelo método de imersão não só mostrou uma maior eficiência do método mas, também, evidenciou a inexistência de plantas altamente resis-  
tentes dentro das variedades testadas. Deste modo, a presen-  
ça de plantas sem sintomas, obtidas no final do experimento, nas parcelas inoculadas pelo método de Armstrong, poderiam ser consideradas como plantas escapes e não como plantas re-  
sistentes. Tais escapes poderiam ser ocasionados tanto pela má distribuição do inóculo, como pela variação na quantidade de ferimentos no sistema radicular, assim como pela maior ou menor suscetibilidade das plantas componentes de cada parce-  
la.

Por outro lado, considerando-se que a doença é um processo dinâmico, resultante da interação patógeno, hospedeiro e meio ambiente, pode-se avaliá-la de dois modos dis-  
tintos. No primeiro, computando-se o resultado final do pro-  
cesso, após um tempo determinado, e a segunda, avaliando-se a evolução do processo pròpriamente dito.

A avaliação do experimento I foi feita, para todos os tratamentos, computando-se apenas o resultado final do

processo, sob a forma de porcentagem de plantas mortas no fim do experimento. Este método de avaliação permitiu tão somente comparar, a grosso modo, os dois métodos de inoculação e as variações dentro dos tratamentos inoculados pelo método de Armstrong, nas menores concentrações, não dando idéia de variação nos tratamentos inoculados por imersão, devido à morte de tôdas as plantas. No entanto, quando se avaliou a doença pela evolução do processo, sob forma de índice de resistência para os tratamentos inoculados por imersão, conseguiu-se diferenciar três variedades testadas em diferentes graus de suscetibilidade, ao nível de 5% de probabilidade, e, ainda, destacar a variedade 1000 das variedades 4000 e 6000, ao nível de 1% de probabilidade.

Ainda, quando se estudaram os efeitos de concentrações de inóculo e idade do hospedeiro, através de porcentagem de plantas mortas no final do experimento, não se conseguiu detectar diferenças entre elas em nenhum dos tratamentos, quer tenham sido inoculados pelo método de imersão, quer pelo de Armstrong. No entanto, a aplicação do índice de resistência às parcelas tratadas pelo método de imersão mostrou que existe uma diferença significativa, ao nível de 1% de probabilidade, entre os efeitos das três concentrações usadas.

Nas parcelas tratadas pelo método de Armstrong, onde a avaliação foi feita unicamente através de porcentagem de plantas mortas, não se conseguiu diferenciar os efeitos de idade do hospedeiro, concentração de inóculo e o efeito das variedades 4000 e 6000, somente se pôde separar o efeito da variedade 1000, ao nível de 1% de probabilidade, das de-

Nos experimentos I e II notou-se que a suscetibilidade das plantas, para um determinado isolamento, no caso o 3700, cresce à medida que se aumenta a concentração do inóculo. Isto exige que na seleção de material para resistência a uma doença se deva ter a cautela de não utilizar, de início, concentrações de inóculo muito elevadas, pois, isto poderia levar a erros, tais como considerar material com certa resistência como suscetível. BALMER (1967) demonstrou que variedades resistentes à murcha de algodão, quando sujeitas a inoculações com alto potencial de inóculo, se mostravam suscetíveis.

No experimento II procurou-se determinar quais as melhores concentrações de inóculo para o trabalho com este Fusarium.

De acôrdo com o comportamento de três variedades de feijão em nove diferentes concentrações de inóculo do isolamento 3700 e através do índice de resistência determinaram-se três grupos de concentrações, um deles mais forte, representado pelas concentrações N/25 e N/50, outro médio, compreendendo as concentrações entre N/75 e N/250 e, finalmente, um fraco, com as concentrações menores que N/500.

Observou-se, também, que no experimento II as variedades testadas mostraram variação na suscetibilidade, sendo que a variedade 6000 se mostrou mais suscetível que as variedades 1000 e 4004. As três variedades usadas mostraram a mesma tendência para o efeito das concentrações de inóculo.

No desenvolvimento dos experimentos I e II notou-se que a resistência das plantas se expressava apenas por atraso no aparecimento dos sintomas. Isto poderia ser explicado pelas condições em que se desenvolveram os experimentos.

As plantas hospedeiras eram cultivadas em areia esterilizada e irrigadas com solução nutritiva, a qual se mostrou adequada ao desenvolvimento do patógeno, quando enriquecida com 2% de sacarose. Dêste modo, em um ambiente praticamente isento de concorrência, o Fusarium poderia se desenvolver nos exudatos das raízes de feijão enriquecidos com solução nutritiva.

SCHROTH (1961) provou existirem, nos exudatos das raízes do feijoeiro, amino-ácidos e açúcares os quais, em concentração de 1%, eram capazes de promover a germinação de 20 a 40% dos clamidosporos de Fusarium solani f. phaseoli.

Dêste modo fica evidente que no primeiro dia de inoculação as plantas estavam sujeitas a um determinado potencial de inóculo. Entretanto, o fungo se desenvolvendo no substrato durante alguns dias, o potencial de inóculo haveria também de aumentar. O aumento crescente do potencial de inóculo dentro de cada parcela seria a verdadeira causa do aparecimento dos sintomas com atraso naquelas plantas inoculadas com as menores concentrações de inóculo.

HORSFALL e DIMOND (1964) indicam que a multiplicação do inóculo se dá de forma logarítmica e que tal processo de aumento pode ser expresso sob a forma exponencial  $I = I_0 e^{rt}$  ou sob a forma logarítmica:  $\log I = \log I_0 + rt \log_e 10$ , onde  $I_0$  é a quantidade inicial de inóculo,  $I$  é a quantidade final em um tempo  $t$  e  $r$  é a razão da multiplicação. No entanto, existe um pequeno engano nesta transformação da fórmula exponencial para logarítmica, a qual, realmente, seria:

$$\log I = \log I_0 + rt \log e.$$

Por essas razões, o correto seria considerar que os resultados obtidos são de uma concentração final de inóculo, que aumentou no substrato das parcelas, durante o experi

mento, a partir da concentração inicial com a qual as plantas foram inoculadas. Os resultados dos efeitos daquelas concentrações usadas só poderiam ser obtidos com o uso de um substrato que não permitisse a multiplicação do fungo.

No experimento III estudou-se o comportamento de diferentes isolamentos "in vitro", conseguindo-se separar dois grupos fisiologicamente diferentes. Nos meios MPA e no de Martin não se notou diferença entre os três isolamentos, mas em BDA, os grupos se evidenciaram. O primeiro, formando bastante micélio aéreo e cultura isenta de pigmento, é representado pelo isolamento 3700, proveniente de feijão e o segundo é composto pelos isolamentos 5800 e 6400, isolados de feijão-vagem, que apresentaram pouco micélio aéreo e pigmentação côr-de-vinho.

No experimento IV pesquisou-se, entre tres isolamentos e três variedades, a existência de variação na patogenicidade dos mesmos. O isolamento 3700 comportou-se de maneira às variedades 1000 e 6003 de feijão, não sendo, no entanto, capaz de causar doença às plantas da variedade de feijão-vagem Manteiga. Os isolamentos 5800 e 6400, do segundo grupo fisiológico, foram patogênicos às 3 variedades testadas.

Esse comportamento diferente do isolamento 3700, tanto em meio de cultura BDA, como na incapacidade de causar doença à variedade de feijão-vagem Manteiga, permite separá-lo dos demais isolamentos como uma raça patogênica diferente.

Dêste modo, pode-se distinguir duas raças patogênicas de F.oxysporum f.phaseoli, a raça 1, a qual pertence o isolamento 3700, não apresentando patogenicidade para a varie

dade diferencial de feijão-vagem Manteiga e a raça 2, à qual pertencem aquêles isolamentos que são patogênicos à variedade diferencial, isto é 5800 e 6400.

Através do índice de resistência estudou-se, no experimento IV, o comportamento dos isolamentos 3700, 5800 e 6400 nas variedades 1000 e 6003 de feijão-sêco em 3 níveis diferentes de inóculo para cada isolamento. As duas variedades testadas mostraram-se diferentes, ao nível de 1% de probabilidade, sendo que a variedade 1000 se mostrou menos suscetível que a 6003. As concentrações de inóculo usadas também se mostraram diferentes entre si, ao nível de 1% de probabilidade, bem como os isolamentos.

Observaram-se interações entre isolamentos e concentrações, bem como entre variedades e isolamentos.

Estudando-se o efeito de isolamentos dentro das concentrações, observou-se que os isolamentos 3700 e 5800, embora pertencentes a raças diferentes, mostraram as mesmas tendências, não havendo diferença entre suas médias nas concentrações N/300 e N/550, as quais diferiram significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, da concentração N/50, em ambos os casos. O isolamento 6400 comportou-se de modo diferente que os demais dentro das concentrações. Assim, sua média na concentração N/550 diferiu significativamente das suas médias nas concentrações N/50 e N/300. Esse resultado mostra a importância do conhecimento da concentração de inóculo a ser usado pois, os isolamentos 5800 e 6400, da mesma raça, apresentam tendências diferentes nas três concentrações de inóculo.

Analisando-se os efeitos dos isolamentos dentro das variedades, notou-se que os isolamentos 3700 e 6400 fo-



ram mais patogênicos à variedade 6003 do que para a variedade 1000. Por outro lado, o isolamento 5800 mostrou-se mais patogênico para a variedade 1000 que para a 6003. Mais uma vez, isolamentos diferentes da mesma raça mostraram tendências diferentes, o que ressalta a importância do uso de um maior número de variedades para se determinar possíveis diferenças, entre biótipos de uma mesma raça que, eventualmente, possam ser classificadas como raças diferentes.

As variedades, por sua vez, apresentaram tendências diferentes dentro dos isolamentos, pois a variedade 1000 não mostrou diferença entre os isolamentos 5800 e 6400, os quais foram significativamente diferentes, ao nível de 1% de probabilidade, do isolamento 3700, mas a variedade 6003 mostrou diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade, para os três isolamentos. Para ambas as variedades, o isolamento 3700, proveniente de feijão-sêco, mostrou-se mais patogênico do que os isolamentos 5800 e 6400, isolados de feijão-vagem. Na variedade 6003 o isolamento 6400 mostrou-se mais patogênico que o 5800 que apresentou, nesta variedade, a menor patogenicidade. Essa interação, evidencia a necessidade de maior número de variedades para o estudo das variações dentro de uma mesma raça patogênica e mesmo entre raças.

No experimento IV estudou-se, em análise separada, o comportamento das variedades 1000, 6003 e Manteiga, inoculadas com os isolamentos provenientes de feijão-vagem, nas seguintes concentrações: N/50 e N/550. Constatou-se que as três variedades diferiram entre si, ao nível de 1% de probabilidade, e que a variedade Manteiga foi a mais resistente e a 6003 a mais suscetível. As concentrações também foram di-

ferentes, ao nível de 1% de probabilidade, e os isolamentos diferiram entre si, ao nível de 5% de probabilidade.

Observou-se, ainda, a existência de interação entre variedades e isolamentos. Analisando-se o efeito da variedade dentro de isolamentos, notou-se que não houve efeito significativo dos isolamentos 5800 e 6400 nas variedades 1000 e Manteiga, mas na variedade 6003 êsses isolamentos diferiram significativamente, ao nível de 1% de probabilidade. Também, o isolamento 5800 foi menos patogênico que o 6400.

Por outro lado, estudando-se o efeito de isolamentos dentro das variedades, notou-se que o isolamento 5800 não diferiu entre as variedades 6003 e Manteiga, mas foi significativamente diferente, ao nível de 1% de probabilidade, na variedade 1000. O isolamento 6400 diferiu, para tôdas as variedades, ao nível de 1% de probabilidade. O isolamento 5800 mostrou maior patogenicidade para a variedade 1000 e o isolamento 6400 foi o mais patogênico na variedade 6003.

Os resultados desta última análise comprovam mais uma vez, a necessidade de se usar um número suficientemente grande de variedades para se ter o perfeito conhecimento das variações entre e dentro das raças patogênicas de um fungo.

## 7. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- 1- O método de inoculação por imersão, quando comparado com o descrito por Armstrong, nas mesmas concentrações de inóculo, mostrou-se mais eficiente, não apresentando plantas escape.

- 2- A severidade da doença pode ser influenciada pela concentração de inóculo.
- 3- O índice de resistência mostrou-se mais eficiente na avaliação dos resultados que o método de porcentagem de plantas mortas no final do experimento.
- 4- As diferentes variedades de feijão apresentaram diferentes graus de suscetibilidade aos isolamentos de Fu-sarium, bem como a um único isolamento.
- 5- Existem, pelo menos duas raças patogênicas de Fusa-rium oxysporum f. phaseoli que se diferenciam fisiologicamente em meio de BDA e, na patogenicidade, para a variedade Manteiga.

## 8. RESUMO

Estudaram-se através de dois métodos de avaliação, os resultados de inoculações feitas com diferentes variedades de feijão, inoculadas pelo método de imersão com Fusa-rium oxysporum f. phaseoli, observando-se que a avaliação feita através do índice de resistência, que mede o processo evolutivo da doença, permitiu estudar as variações apresentadas pelas variedades e concentrações de inóculo, enquanto que a avaliação através da porcentagem de plantas mortas ao final do experimento não permitiu análise, pois não apresentou variancia.

Pelo método de Armstrong estudaram-se, também, as variações das concentrações de inóculo, variedades e idades dos hospedeiros avaliadas sob forma de porcentagem de plan-

tas mortas. Neste caso conseguiu-se tão somente separar o e feito de uma das variedades das demais, não se tendo obtido efeito significativo para concentrações de inóculo nem para idade das plantas.

Comparando-se os dois métodos de inoculação, nota-se que o de imersão é mais preciso que o de Armstrong pois o primeiro, nas mesmas concentrações de inóculo, não apresentou plantas escapes, as quais foram observadas no segundo.

Estudou-se o efeito de nove diferentes concentrações de inóculo de isolamento 3700 em 3 variedades inoculadas pelo método de imersão e avaliados sob forma de índice de resistência, tendo-se observado diferenças significativas entre as variedades e entre as concentrações de inóculo. Notou-se, ainda, que, nas condições em que eram conduzidos os experimentos, o efeito de maior ou menor suscetibilidade apresentado pelas plantas traduzia-se em maior ou menor velocidade no aparecimento dos sintomas.

Testes feitos com três variedades de Phaseolus vulgaris e isolamentos provenientes de feijão-sêco e feijão-vagem inoculados pelo método de imersão revelaram que existem pelo menos duas raças patogênicas de Fusarium oxysporum f. phaseoli. A Raça 1, representada pelo isolamento 3700 de feijão, não apresentou patogenicidade para a variedade Manteiga de feijão-vagem e a Raça 2, representada pelos isolamentos 5800 e 6400 de feijão-vagem, mostrou-se patogênica a essa variedade de diferencial.

"In vitro" os três isolamentos mostraram dois grupos fisiologicamente distintos, quando cultivados em BDA. O isolamento de Raça 1 nesse meio produziu colônias brancas com abundante micélio aéreo, enquanto que os isolamentos da

Raça 2 produziram colônias com escasso micélio aéreo e com coloração de vinho.

Observou-se ainda existirem entre os isolamentos da Raça 2 diferenças significativas para os efeitos de concentrações de inóculo e na patogenicidade, em diferentes variedades.

## 9. SUMMARY

Two methods of inoculation were evaluated with different varieties of beans inoculated by the dipping method. It was observed that the evaluation made by the index of resistance that measures the development of symptoms, permitted the study of variations of varieties and concentrations of inoculum, whereas the evaluation through the percentage of dead plants at the end of the experiment did not permit an analysis in view of the fact that there was no variance.

Armstrong's method of inoculation was used in evaluating the effect of different concentrations of inoculum, varieties, ages of host plants by the percentage of

dead plants. In this case it was only possible to separate the effect of one of the varieties from the others. No significant differences were obtained for concentrations of inoculum nor for age of plants.

Of the two methods of inoculation used it was noted that the dipping method was more precise than the Armstrong since escapes did not occur when the dipping method was used.

Three varieties were inoculated with nine differ-

ent concentrations of inoculum of isolate 3700 using the dipping method. Notes were taken as the index of resistance. Significant differences were observed between the varieties and between the concentrations of inoculum. Under the conditions of the experiment, the high or low degrees of susceptibility was correlated with a rapid or slow appearance of symptoms.

Tests made with three varieties of Phaseolus vulgaris and isolates from beans and snap beans inoculated by the dipping method revealed that there are at least 2 pathogenic races of Fusarium oxysporum f. phaseoli in the State of São Paulo. Race 1, represented by isolate 3700 of beans was not pathogenic on the "manteiga" variety of snap beans, and Race 2 represented by isolates 5800 e 6400 of snap beans was pathogenic to this differential variety.

Culturally on PDA, the 3 isolates were placed in 2 physiologically distinct groups. The isolate of Race 1 in this medium produced white colonies, with abundant aero mycelia whereas the isolate of Race 2 produced dark red colonies with little aero mycelia.

It was also observed that there are significant differences between isolates of Race 2 in the effects of inoculum of different concentrations and in pathogenicity of different varieties.

10. BIBLIOGRAFIA

- ARMSTRONG, G.M. e JOANNE K.ARMSTRONG, 1963. Fusarium wilt of bean in South Carolina and some host relations of bean Fusarium. Plant Disease Repr. 47: 1088-1091.
- ARMSTRONG, G.M. e JOANNE K.ARMSTRONG, 1964 a. Lupinus Espe cies - Common host for wilt Fusarium from alfalfa, cowpea, lupine, and U.S. cotton. Phytopathology 54: 1232-1235.
- ARMSTRONG, G.M. e JOANNE K.ARMSTRONG, 1964 b. Pathogenicity of isolates of bean wilt Fusarium from England and United States. Plant Disease Repr. 48: 846-847.
- ARMSTRONG, JOANNE K. e G.M. ARMSTRONG, 1938. A race of cotton wilt Fusarium causing wilt of Yelredo Soybean and Flue-cured Tobacco. Plant Disease Repr. 42: 147-151.
- BALMER, E., 1967. Contribuição ao estudo das relações entre Fusarium oxysporum f. vasinfectum (Atk.) Snyder e Hans. e Gossypium hirsutum L. Tese de Doutorado apresentada na E.S.A. "Luiz de Queiroz" - Piracicaba. 47 pp.
- CARDOSO, C.O.N., H. KIMATI e N.G. FERNANDES, 1966. Nota sô bre a ocorrência de Fusarium oxysporum f. phaseoli (Schlecht) Kendrick & Snyder causando murcha vascular em feijoeiro. Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz" XXIII: 273-276.
- CASTILHO, A. de, L.S.P. PEREIRA, F.P. GOMES, R.S. MORAES e H. de CAMPOS, 1965. A contribuição das cooperativas de cafeicultores na melhoria do tipo de cafe. Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz" XXII: 175-181.
- DIMOND, A.E. e J.G. HORSFALL, 1965. Theory of inoculum. 404-415. In K.F. BAKER e W.C. SNYDER (Edt.). Ecology of Soil-Borne Plant Pathogens - Prelude to Biological Control - University of California Press - Berkeley, Los Angeles.

- GOMES, F.P., 1966. Curso de Estatística Experimental, 3<sup>a</sup> Edição USP E.S.A. "Luiz de Queiroz" - Piracicaba - 404 pp.
- HARTER, L.L., 1929. A Fusarium disease of beans. (Abst.). Phytopathology 19: 84.
- KENDRICK, J.B., 1934. Seed transmission of Fusarium Yellows of beans. (Abst.). Phytopathology 24: 1139.
- KENDRICK, J.B. e W.C. SNYDER, 1942. Fusarium Yellows of beans. Phytopathology 32: 1010-1014.
- MALAVOLTA, E. e H.P. HAAG, 1964. Curso Internacional de diagnose foliar. IICA. E.S.A. "Luiz de Queiroz" - Piracicaba. Mimeografado 5 pp.
- 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.
- SCHROTH, M.N. e W.C. SNYDER, 1961. Effect of host exudate on chlamydospores germination of bean root rot fungus, Fusarium solani f. phaseoli. Phytopathology 51: 389-393.
- WELLMAN, F.L., 1939. A technique for studying host resistance and pathogenicity in tomato Fusarium wilt. Phytopathology 29: 945-956.



11. AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Ferdinando Galli, pela orientação e pela revisão dos originais;

aos Professores Dr. H. Campos e Dr. E. Balmer pelas sugestões e críticas nos trabalhos de análise estatística;

ao colega Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> T. Kimoto pelo fornecimento de sementes de feijão-vagem;

ao colega Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> T. Namekata pelo fornecimento da cultura 6400;

à minha esposa e colega Eng<sup>a</sup> Agr<sup>a</sup> Elke J.B.N. Cardoso por sugestões e revisão do português;

aos Professores Dr. H. Tokeshi, Dr. P.C.T. Carvalho e Dr. C.C. Allison, assim como, aos colegas Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> H. Kimati e Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> C. Salgado por sugestões;

aos estudantes N.G. Fernandes, Guanabara P. Barros e P.F. Aragão, bolsistas da Cadeira de Fitopatologia, pela ajuda imprescindível nos trabalhos realizados;

à Fundação Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, à Fundação Rockefeller e à Aliança Para o Progresso, pelos recursos que, em diferentes oportunidades, forneceram à Cadeira de Fitopatologia e que permitiram o desenvolvimento do presente trabalho;

a todos que direta ou indiretamente colaboram com a realização deste trabalho.